



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA HUMORAL INDUZIDA PELA
VACINAÇÃO PARA ESGANA E PARVOVIROSE CANINAS

ANA BEATRIZ DE MATOS MACHADO VILA NOVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2017

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA HUMORAL INDUZIDA PELA
VACINAÇÃO PARA ESGANA E PARVOVIROSE CANINAS

ANA BEATRIZ DE MATOS MACHADO VILA NOVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2017

Lisboa

Às minhas queridas avós, os meus anjos da guarda,

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo tenho de agradecer por ter chegado até aqui, por tudo o que vivi durante estes anos de estudante na FMV e por tudo aquilo que a veterinária me trouxe de bom.

Tenho de expressar a minha enorme gratidão aos meus orientadores, que foram incansáveis durante esta fase, sempre disponíveis e preocupados. À Professora Solange Gil, uma excelente pessoa que tive a oportunidade de conhecer melhor. Muito obrigada pela orientação, disponibilidade e incentivo que sempre me transmitiu durante a escrita desta dissertação. Agradeço também ao Professor Vírgilio Almeida, meu co-orientador, por todos os conhecimentos e conselhos que me deu, pela paciência, motivação e amizade.

Agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, pelo seu amor incondicional, por sempre me terem apoiado em todas as minhas decisões, por serem um exemplo para mim e por me ensinarem a lidar com as adversidades da vida, sem vocês nada seria possível. A eles devo tudo aquilo que sou e espero um dia conseguir retribuir-lhes isso.

Aos meus queridos avós por estarem sempre presentes, mesmo quando estão mais longe.

Ao Bernardo, por tudo aquilo que já passámos e por tudo o que ainda virá, obrigada por me aturares todos os dias nos altos e baixos da vida, obrigada pelo teu amor, por cuidares de mim e pelo apoio que me dás sempre, sem ti não teria sido a mesma coisa.

Ao meu irmão, por me mostrar diferentes formas de olhar a vida.

À minha melhor amiga Ana Neves, a minha companheira de curso, uma pessoa que é como uma irmã para mim, que sempre me deu incentivo e me mostrou que o sucesso depende apenas da capacidade de cada um para ultrapassar os obstáculos que surgem no nosso caminho. Obrigada por todos os momentos que passámos juntas, todas as gargalhadas, todas as cantorias, todas as lágrimas, por tudo. Estiveste sempre lá para mim e sei que vais estar para sempre comigo.

À Carolina Fonseca, a minha grande amiga que me acompanha desde a escola secundária. Apesar de termos seguido percursos académicos diferentes nunca nos afastámos e sempre nos apoiámos nos bons e maus momentos.

À Beatriz Lourenço, a minha companheira de estágio, uma pessoa que me mostrou que a vida é para ser vivida com descontração e sempre com um sorriso na cara.

Queria também agradecer às professoras Berta São Braz, Luísa Mateus e Manuela Oliveira pela ajuda preciosa que me deram para a realização deste trabalho.

À Zoetis por ter cedido os *kits* ELISA que foram utilizados neste trabalho.

Agradeço ao corpo clínico e a todos os funcionários do HEV pela confiança, paciência e carinho demonstrados durante o estágio e por todo o conhecimento que comigo compartilharam. Levo um bocadinho de cada um de vós no meu coração.

Não posso deixar de agradecer aos tutores dos animais que participaram neste estudo pois sem a sua disponibilidade e consentimento este trabalho não teria sido possível.

Por fim, agradeço aos meus amigos por me terem acompanhado neste percurso, pelos momentos de descontração que me proporcionaram, pela compreensão e preocupação que sempre demonstraram, eles sabem quem são.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA HUMORAL INDUZIDA PELA VACINAÇÃO PARA ESGANA E PARVOVIROSE CANINAS

O vírus da esgana (CDV) e o parvovírus (CPV) são dois vírus responsáveis por elevadas taxas de mortalidade nas populações caninas, que infetam cães não vacinados ou com protocolos vacinais incompletos.

As vacinas têm desempenhado um papel fundamental na prevenção destas doenças no entanto, a vacinação não é um procedimento inócuo e deve ser realizado apenas com a frequência necessária para manter os cães imunizados. Por outro lado, são vários os fatores que podem originar falhas na imunização, sendo a neutralização do antigénio vacinal por anticorpos maternos a causa mais comum.

Neste estudo foi avaliada a proteção humoral para o CDV e CPV a 13 cachorros durante a primovacinação (Grupo A e Grupo B) e, a 7 cães adultos, não vacinados há pelo menos 3 anos (Grupo C). O grupo A incluiu 5 cachorros com início do protocolo vacinal às 6 semanas e o grupo B contemplou 8 animais que iniciaram a primovacinação entre as 8 e as 12 semanas. De cada animal foram recolhidas três amostras de sangue, coincidentes com as consultas de vacinação, com 3 a 4 semanas de intervalo.

A resposta humoral foi avaliada recorrendo a testes rápidos, baseados na técnica de ELISA indireta para deteção de anticorpos, que permitem avaliar de forma rápida, simples e económica a proteção ou suscetibilidade de cada animal.

Verificámos que a resposta à vacinação para CDV foi mais precoce em comparação com a resposta para CPV. Relativamente ao CPV, 80% dos animais do grupo A, ainda se encontravam desprotegidos após a administração de duas doses da vacina. Já os animais do grupo B revelaram proteção humoral para CPV após duas administrações vacinais, sendo que quatro animais (50%) ficaram logo protegidos após a primeira dose.

Nos cães adultos foi realizada apenas uma colheita de sangue que funcionou como um rastreio serológico para aferir a necessidade de revacinação.

Os resultados obtidos sugerem que, durante a primovacinação, a resposta à vacinação é individual e depende sobretudo do título inicial de anticorpos maternos adquirido pelo neonato. A variabilidade encontrada reforça a necessidade da determinação dos níveis de imunidade humoral individuais. Deste modo, os *kits* de ELISA são uma ferramenta muito vantajosa, pois permitem avaliar a proteção a um custo relativamente reduzido. Estes testes deverão ser utilizados para validar a eficácia vacinal induzida pela primovacinação, auxiliando o médico veterinário a estabelecer protocolos vacinais individuais.

Palavras-Chave: CPV, CDV, eficácia vacinal, primovacinação, revacinação, imunidade humoral, ELISA.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE INDUCED BY VACCINATION FOR CANINE DISTEMPER AND PARVOVIRUS

Canine distemper virus (CDV) and parvovirus (CPV) are two viruses responsible for high mortality rates in the canine population that infect unvaccinated dogs and dogs with incomplete vaccination protocols.

Vaccines continue to play a key role on the prevention of these diseases however vaccination is not an innocuous procedure and must be done only with the required frequency to keep dogs immunized. On the other hand, there are several factors that can lead to immunization failures, being the neutralization of the vaccine antigen by the maternal antibodies the main cause.

In this study, the humoral protection for CDV and CPV was evaluated in 13 dogs during primary vaccination (Group A and Group B) and in 7 adult dogs that had not been vaccinated for at least 3 years (Group C). Group A included 5 dogs which started the vaccine protocol at 6 weeks and group B included 8 animals that started primary vaccination at 8 to 12 weeks. Three blood samples were collected from each animal, coincident with the vaccination visits, at 3 to 4 weeks apart.

The humoral response was evaluated using rapid tests based on the indirect ELISA technique for antibody detection, which allow a rapid, simple and economical evaluation of the protection or susceptibility of each animal.

We found that the response to CDV vaccination was precocious compared to the response to CPV. With regard to CPV, 80% of group A dogs were still unprotected after administration of two doses of the vaccine. In contrast, the dogs of group B showed humoral protection for CPV after two vaccination administrations, with four dogs (50%) being protected immediately after the first dose.

In adult dogs, only one blood sample was taken for serological screening to estimate the need for revaccination.

The results suggest that during primary vaccination the response to vaccination is individual and mostly depends on the initial titer of maternal antibodies acquired by the neonate. The variability found supports the need to measure individual humoral immunity levels. Thus the ELISA kits are a very helpful tool, because they allow the evaluation of the protection at a relatively reduced cost. These tests should be used to validate the vaccine efficacy induced by primary vaccination, helping the veterinarian to establish individual vaccination protocols.

Key words: CPV, CDV, vaccine efficacy, primary vaccination, revaccination, humoral immunity, ELISA.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xi
Índice de Gráficos.....	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiii
I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
II. INTRODUÇÃO	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Parvovírus Canino	5
1.1. Etiologia.....	5
1.2. Epidemiologia	5
1.3. Patogenia da infecção	Erro! Marcador não definido.
1.4. Sinais clínicos	7
1.5. Diagnóstico.....	8
1.6. Tratamento e Prognóstico.....	8
1.7. Prevenção	9
2. Esgana Canina	10
2.1. Etiologia.....	10
2.2. Epidemiologia	10
2.3. Patogenia da infecção	Erro! Marcador não definido.
2.4. Sinais clínicos.....	11
2.5. Diagnóstico.....	12
2.6. Tratamento e Prognóstico.....	13
2.7. Prevenção	14
3. Imunidade.....	15
3.1. Sistema imunitário	15
3.1.1. Antigénio.....	18
3.1.2. Immunoglobulinas.....	18
3.2. Imunidade inata e Imunidade adquirida	18
3.2.1. Imunidade inata	18
3.2.2. Imunidade adquirida	20
3.2.3. Imunidade humoral <i>versus</i> imunidade celular	20
3.3. Imunidade passiva.....	20
3.3.1. Anticorpos maternos	21
3.4. Immunoprophylaxis	24
3.5. Duration of immunity.....	25

4.	Vacinação.....	26
4.1.	Tipos de vacinas.....	26
4.2.	Vacinas nucleares, não-nucleares e não recomendadas	28
4.3.	Vacinas polivalentes e monovalentes	29
4.4.	Calendário Vacinal.....	30
4.4.1.	Primovacinação	31
4.4.2.	Vacinação na idade adulta	32
4.5.	Falhas vacinais	33
4.6.	Avaliação pós-vacinal da resposta humoral	36
4.6.1.	Testes para avaliação da imunidade humoral	36
IV.	ESTUDO EXPERIMENTAL	39
1.	CrITÉRIOS de inclusão	39
2.	CrITÉRIOS de exclusão	39
3.	Material e MéTODOS	40
4.	Amostragem	39
4.1.	Grupo A	39
4.2.	Grupo B	41
4.3.	Grupo C	42
5.	Testes utilizados	43
V.	RESULTADOS	45
1.	Primovacinação com início às 6 semanas de idade (Grupo A)	45
1.1.	Resultados do grupo A para o vírus da esgana	46
1.2.	Resultados do grupo A para o parvovírus	47
2.	Primovacinação com início entre as 8 e as 12 semanas de idade (Grupo B)	47
2.1.	Resultados do grupo B para o vírus da esgana	48
2.2.	Resultados do grupo B para o parvovírus	49
3.	Rastreio imunitário de animais não vacinados há pelo menos 3 anos (Grupo C) ...	50
VI.	DISCUSSÃO	51
1.	Grupo A - Primovacinação com início às 6 semanas de idade.....	51
2.	Grupo B - Primovacinação com início entre as 8 e as 12 semanas de idade	52
3.	Grupo C - Rastreio imunitário de animais não vacinados há pelo menos 3 anos ...	53
VII.	CONCLUSÃO.....	55
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	57
IX.	ANEXOS	63
	ANEXO I – CALENDÁRIO VACINAL RECOMENDADO PELA WSAVA.....	65
	ANEXO II - BASE DE DADOS.....	66
	ANEXO III - RESULTADOS.....	69
	ANEXO IV – INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO <i>KIT</i> TITERCHEK® CDV/CPV.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Janela de suscetibilidade aos agentes infecciosos que circulam numa população (adaptado de Morein <i>et al.</i> , 2002).....	24
Figura 2 - TiterCHEK® CDV/CPV test.	43
Figura 3 - Técnica de ELISA indireta (adaptado de Day, 2014).	43
Figura 4 - Exemplo dos resultados obtidos após realização do teste rápido.	44
Figura 5 - Leitura dos resultados do grupo A.....	69
Figura 6 - Leitura dos resultados do grupo B.....	71
Figura 7 - Leitura dos resultados do grupo C.	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre imunidade inata e imunidade adquirida.	19
Tabela 2 - Concentração de imunoglobulinas no sangue da progenitora, no sangue do cachorro, no colostro e no leite materno (adaptado de Heddle & Rowley, 1975 in Day, 2007).....	22
Tabela 3 - Combinações de vacinas disponíveis em Portugal.	29
Tabela 4 - Exemplo de um calendário vacinal, para os cães residentes em Portugal, baseado nas últimas recomendações da WSAVA.	31
Tabela 5 - Fatores que podem influenciar a eficácia da vacinação (adaptado de Greene & Levy, 2012).	34
Tabela 6 - Idades dos animais do grupo A aquando da colheita das várias amostras.	41
Tabela 7 - Idades dos animais do grupo B aquando da colheita das várias amostras.	42
Tabela 8 - Idades dos animais do grupo C e o tempo decorrido desde a última vacinação..	42
Tabela 9 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A.	45
Tabela 10 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B.	48
Tabela 11 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C.	50
Tabela 12 - Calendário vacinal recomendado pela WSAVA (adaptado de Day <i>et al.</i> , 2016). ..	65
Tabela 13 - Base de dados construída durante o estágio.	66
Tabela 14 - Identificação dos animais do grupo A.	69
Tabela 15 - Valores de absorvância das amostras do grupo A (D.O. do Controlo Positivo: 1,94).....	69
Tabela 16 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A.	69
Tabela 17 - Rácio entre o controlo positivo e as amostras do Grupo A.	70
Tabela 18 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A tendo em conta o valor do controlo positivo.	70
Tabela 19 - Identificação dos animais do grupo B.	71
Tabela 20 - Valores de absorvância das amostras do grupo B (D.O. do Controlo Positivo: 1,635).....	71
Tabela 21 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B.	71
Tabela 22 - Rácio entre o controlo positivo e as amostras do Grupo B.	72
Tabela 23 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B tendo em conta o valor do controlo positivo.	72
Tabela 24 - Identificação dos animais do grupo C.....	73
Tabela 25 - Valores de absorvância das amostras do grupo C (D.O. do Controlo Positivo=1,85).	73
Tabela 26 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C.....	73

Tabela 27 - Rácio entre o controlo positivo e as amostras do Grupo C.	74
Tabela 28 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C tendo em conta o valor do controlo positivo.	74

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxas de proteção do grupo A para a esgana e para o parvovírus.....	46
Gráfico 2 - Resultados para CDV após medição das densidades óticas das amostras do grupo A no espectrofotómetro.	46
Gráfico 3 - Resultados para CPV após medição das densidades óticas das amostras do grupo A no espectrofotómetro.	47
Gráfico 4 - Taxas de proteção do grupo B para esgana e parvovírus.	48
Gráfico 5 - Resultados para CDV após medição das densidades óticas das amostras do grupo B no espectrofotómetro.	49
Gráfico 6 - Resultados para CPV após medição das densidades óticas das amostras do grupo B no espectrofotómetro.	49
Gráfico 7 - Resultados para o CPV e CDV após medição no espectrofotómetro das densidades óticas das amostras do grupo C.	50

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ac	–	Anticorpo
AcM	–	Anticorpo materno
ADN	–	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	–	Antigénio
ARN	–	Ácido Ribonucleico
CAMV	–	Centro de Atendimento Médico Veterinário
CAV	–	Canine Adenovirus
CDV	–	<i>Canine Distemper Virus</i> (Vírus da Esgana)
CID	–	Coagulação intravascular disseminada
CPV	–	<i>Canine Parvovirus</i> (Parvovirus Canino)
DI	–	Duração da imunidade
DO	–	Densidade ótica
ELISA	–	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HEV	–	Hospital Escolar Veterinário
Ig	–	Imunoglobulina
IgA	–	Imunoglobulina A
IgE	–	Imunoglobulina E
IgD	–	Imunoglobulina D
IgG	–	Imunoglobulina G
IgM	–	Imunoglobulina M
IH	–	Inibição da Hemaglutinação
MSAL	–	Molécula Sinalizadora de Ativação Linfocítica
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	–	Período de Incubação
SI	–	Sistema imunitário
SN	–	Seroneutralização
SNC	–	Sistema Nervoso Central
SPF	–	<i>Specific Pathogen Free</i>
UIDI	–	Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas
VVA	–	Vacina Viva Atenuada
WSAVA	–	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>

I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular que serviu de base à realização deste trabalho, teve lugar no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, decorrendo entre os dias 1 de Março e 5 de Setembro de 2016 sob orientação da Professora Doutora Solange Gil e do Professor Doutor Virgílio Almeida. Relativamente à carga horária, foram realizados turnos de 8 ou 12 horas, totalizando 1400 horas.

Durante estes 6 meses, o estágio foi rotativo pelos vários serviços do HEV, nomeadamente:

- a) Internamento da Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas (UIDI) – A UIDI existe desde Outubro de 2013 e destina-se ao internamento de animais com doença infecciosa confirmada ou de animais com suspeita clínica de doença infecciosa que se encontrem a aguardar diagnóstico laboratorial. A capacidade de identificar estes animais aliada à existência de uma UIDI é essencial para o controlo e prevenção de doenças infecciosas em ambiente hospitalar.
- b) Internamento Geral – Neste serviço foi possível compreender a complexidade da gestão de um internamento, quais os seus desafios e a grande responsabilidade do médico veterinário internista, principalmente na presença de pacientes críticos.
- c) Medicina Interna – Assistência a um elevado número de consultas, auxiliando na realização da anamnese e exame clínico do animal, elaboração de planos de diagnóstico e instituição dos tratamentos adequados.
- d) Especialidades clínicas – Oncologia, Ortopedia, Dermatologia, Oftalmologia, Cardiologia, Comportamento, Exóticos.
- e) Serviço de Urgências.
- f) Cirurgia – Preparação dos animais para a cirurgia, administração da pré-medicação, monitorização da anestesia, acompanhamento pós-cirúrgico dos animais durante o período de recobro.
- g) Imagiologia – Acompanhamento dos serviços de radiografia, ecografia, endoscopia e de tomografia axial computadorizada.

Ao longo do estágio curricular tive a oportunidade de realizar exames físicos, triagens, técnicas de contenção, vacinações, preparação e administração de medicamentos (pelas vias oral, subcutânea, endovenosa e intramuscular), colheitas de sangue, colocação de cateteres endovenosos, algaliações (tanto de machos como de fêmeas), enemas, medições de glicémia, sedação e anestesia, punções aspirativas por agulha fina, colocação de tubo endotraqueal, alimentação através de sonda nasogástrica/nasoesofágica, preparação de sistemas de fluidoterapia, bem como outras tarefas inerentes aos cuidados hospitalares dos animais internados.

Durante o acompanhamento do Serviço de Medicina Interna, muitas vezes iniciava as consultas, recolhendo a história pregressa, o estímulo iatrotrópico e realizando o exame físico. De seguida, a consulta era conduzida pelo médico veterinário responsável, que prosseguia no acompanhamento do paciente.

Assisti ainda a várias discussões de casos clínicos com os médicos do HEV, que tinham como objetivo enriquecer e reforçar conhecimentos sobre algumas doenças. Estas reuniões decorriam semanalmente.

II. INTRODUÇÃO

A esgana e a parvovirose são duas doenças infecciosas virais, potencialmente fatais, que afetam o cão e, que podem ser prevenidas através da vacinação. Em Portugal, estas doenças são endémicas e continuam a ter um grande impacto na população canina, especialmente em locais onde existem muitos animais, como abrigos municipais ou canis de criadores.

Uma das medidas mais eficazes para a prevenção de doenças infecciosas é a vacinação. No entanto, as vacinas não são inócuas para o organismo e devem ser utilizadas com base na evidência científica, e, apenas o número de vezes necessárias para manter os animais protegidos (Almendra *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, os fabricantes de vacinas para uso veterinário recomendavam revacinações anuais, porém, nos últimos anos começaram a levantar-se dúvidas acerca da necessidade da administração anual destas vacinas.

Com a consciencialização para os possíveis efeitos adversos da vacinação recorrente em animais de companhia, a par com o aumento da sua esperança média de vida, a comunidade científica veterinária dinamizou-se no sentido de avaliar a verdadeira necessidade da revacinação anual e qual o custo-benefício que essa prática implica para os animais de companhia, nomeadamente o cão e o gato.

No que diz respeito às vacinas nucleares, o protocolo de primovacinação recomendado pode ser iniciado às 6 semanas de idade e consiste na administração de vários reforços vacinais, com 3 a 4 semanas de intervalo, até às 16 semanas de vida do cão, altura em que a interferência entre os anticorpos maternos e o antígeno vacinal já é muito reduzida ou nula. Um animal adulto deve ser vacinado de 3 em 3 anos (Day *et al.*, 2016).

Não é possível assumir-se que todo o animal vacinado esteja protegido, ou que a revacinação é sempre necessária, como tal, a indústria farmacêutica tem desenvolvido testes capazes de indicar de forma objetiva a necessidade de revacinação.

Atualmente, já é possível confirmar se o sistema imunitário do cão respondeu eficazmente à vacinação, recorrendo à utilização de testes rápidos baseados na técnica de ELISA indireto, realizados 3 a 4 semanas após a administração da vacina, avaliando assim a necessidade do reforço vacinal (Day *et al.*, 2016).

Foi com estes testes rápidos que avaliámos a resposta à vacina de 13 cachorros, durante a primovacinação e, de 7 cães adultos, não vacinados há pelo menos três anos.

Esta dissertação tem dois objetivos principais: (1) avaliar de forma qualitativa a resposta imunitária humoral durante a primovacinação de cachorros; (2) aferir a presença de títulos de anticorpos (Ac's) protetores em cães adultos não vacinados há pelo menos 3 anos, através de *kits* rápidos de ELISA.

A grande relevância da medição dos títulos de Ac's é providenciar a capacidade de aferir se o animal respondeu adequadamente à vacinação e utilizar essa informação na decisão da necessidade de revacinar (Twark & Dodds, 2000). Esta avaliação permite reduzir o número de vacinações administradas desnecessariamente durante a vida dos cães e detetar eventuais falhas vacinais, diminuindo o número de animais suscetíveis numa população.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Parvovírus Canino

1.1. Etiologia

O parvovírus é um vírus ADN de cadeia simples, sem envelope lipoproteico, que pertence à família *Parvoviridae* (Crawford & Sellon, 2010; Sykes, 2014). Este agente infeccioso encontra-se mundialmente distribuído, sendo considerado uma das causas mais frequentes de enterite viral canina (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012; Sykes, 2014).

Existem dois tipos de parvovírus com capacidade para infetar canídeos: o parvovírus canino-1 (CPV-1) e o parvovírus canino-2 (CPV-2). O CPV-1 é considerado benigno para a maioria dos cães, à exceção dos cachorros até às 3 semanas de vida que podem apresentar sinais clínicos relacionados com enterite, pneumonia, miocardite e linfadenite (Greene & Decaro, 2012). O CPV-2 exibe maior virulência sendo responsável pelo desenvolvimento de uma enterite viral, vulgarmente denominada por parvovirose (Greene & Decaro, 2012; Willard, 2014).

Até à data foram identificados três subtipos de CPV-2 (a, b e c) que podem provocar uma gastroenterite hemorrágica, altamente contagiosa e fatal, sobretudo em cachorros (Sykes, 2014; Willard, 2014).

1.2. Epidemiologia

O CPV é um vírus altamente contagioso que afeta na natureza o cão doméstico e outros canídeos selvagens, como por exemplo raposas, lobos e coiotes (Greene & Decaro, 2012).

Apesar do vírus original CPV-2 apenas induzir infeção sistémica e intestinal em canídeos, os subtipos emergentes são capazes de infetar felídeos, em condições de infeção natural ou experimental (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012).

A transmissão ocorre por via fecal-oral, por contacto direto com fezes de animais doentes ou através de fomites ou vetores mecânicos como roedores e insetos (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012).

O CPV é muito estável e resistente, podendo persistir no meio ambiente por mais de um ano (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012) e permanecer no pêlo do animal durante algum tempo.

Esta resistência às condições ambientais, aliada à capacidade de infetar vários hospedeiros, contribui para a perpetuação do CPV na natureza, sendo por isso considerado um vírus ubiqüitário (Greene & Decaro, 2012).

O período de incubação (PI) do CPV-2 original é de 7 a 14 dias (Sykes, 2014) mas, em relação às estirpes emergentes, o PI pode ser de 4 a 6 dias (Greene & Decaro, 2012).

Os cachorros entre as 6 semanas e os 6 meses de idade das raças Rottweiler, Doberman Pinscher, Labrador Retriever, American Staffordshire Terrier, Pastor Alemão e Malamute do Alaska parecem ter um risco acrescido de contrair a doença (Greene & Decaro, 2012). Pensa-se que esta vulnerabilidade esteja associada a uma fraca resposta imunitária humoral à vacinação e com a persistência de anticorpos maternos para além da idade em que se conclui a primovacinação (Bird & Tappin, 2013).

1.3. Patogenia da infeção

A replicação viral inicia-se no tecido linfoide da orofaringe, linfonodos mesentéricos e timo, ocorrendo posteriormente, entre o 1.º e o 5.º dia após a infeção, o período de virémia, no qual ocorre a disseminação do vírus através da corrente sanguínea para as criptas do intestino delgado (Crawford & Sellon, 2010).

Devido ao elevado tropismo para os locais de rápida divisão celular, o CPV vai localizar-se predominantemente no epitélio gastrointestinal, mas também na mucosa oral, língua, esófago, tecido linfoide e na medula óssea (Greene & Decaro, 2012; Sykes, 2014).

Ao infetar as células do epitélio germinal das criptas intestinais, o CPV vai induzir necrose, dando origem à destruição e colapso do epitélio intestinal (Crawford & Sellon, 2010). Já na medula óssea vai causar a destruição dos precursores de leucócitos e células linfoides mitoticamente ativas, resultando em neutropénia e linfopénia (Greene & Decaro, 2012).

A excreção ativa dos subtipos de CPV-2 inicia-se entre o 3.º e o 4.º dia após contacto e geralmente começa antes do aparecimento de sinais clínicos, podendo manter-se por um período variável de 7 dias a várias semanas após infeção (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012). Este período varia consoante o tempo necessário para que o animal estabeleça uma resposta imunitária local eficiente, capaz de inibir a excreção viral (Greene & Decaro, 2012).

Nos animais com infeção subclínica que muitas vezes nem demonstram sinais clínicos, ou estes são muito leves e passageiros, também é detetada a excreção do vírus para o meio ambiente (Crawford & Sellon, 2010).

A partir do 3.º ou 4.º dia após o contacto com o agente, já é possível detetar anticorpos no soro de um animal infetado (Greene & Decaro, 2012).

1.4. Sinais clínicos

Uma infecção pelo CPV pode passar despercebida, principalmente em cães adultos previamente vacinados. Quando ocorrem, os sinais são mais graves em animais jovens, de crescimento rápido e com infecções concomitantes, nomeadamente parasitismo intestinal (Crawford & Sellon, 2010).

A resposta clínica de um cão, após contactar com o CPV, varia desde infecção inaparente até doença hiperaguda fatal (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012). Esta variação depende da dose viral inoculada, idade, estatuto imunitário e da presença de outros agentes patogénicos a nível entérico, como parasitas ou bactérias (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012). Em animais suscetíveis, as taxas de morbilidade e mortalidade podem atingir valores elevados. Os casos mais graves ocorrem normalmente em cachorros com menos de 12 semanas (Bird & Tappin, 2013).

A enterite provocada pelo CPV pode progredir rapidamente, especialmente quando se tratam dos subtipos a, b e c do CPV-2. Frequentemente o vômito é o primeiro sinal de alerta, seguindo-se a diarreia, anorexia, letargia, fraqueza e desidratação (Greene & Decaro, 2012).

As fezes podem estar mais amareladas com laivos de sangue ou mesmo escurecidas devido à presença de sangue digerido, ocorre também expulsão de tecido epitelial intestinal necrosado que dá às fezes um cheiro característico. O cão pode apresentar aumento da temperatura retal (40 a 41 °C) e leucopénia, especialmente nos casos mais graves. Também é possível que a contagem total de leucócitos esteja dentro dos parâmetros normais, isto porque poderá haver linfopénia e neutrofilia concomitantes. Esta neutrofilia é justificada pela presença de bactérias em circulação que podem despoletar o síndrome de resposta inflamatória sistémica aumentando o risco de mortalidade (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012). A perda de fluídos e proteínas, através do vômito incoercível e diarreia profusa, podem culminar em desidratação grave e choque hipovolémico. Nestes casos é provável que o animal apresente hipotermia (Crawford & Sellon, 2010).

A invaginação intestinal é uma complicação grave desta doença, que contribui para um prognóstico mais reservado. A morte do animal pode ocorrer em apenas dois dias após o início da doença e está frequentemente associada a choque séptico e/ou coagulação intravascular disseminada (CID) (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012).

O CPV pode também provocar miocardite, em cachorros que contactam com o vírus ainda no útero materno ou até às 6-8 semanas de idade, culminando na morte do animal que pode ser súbita ou ocorrer após episódios de dispneia e vômito (Greene & Decaro, 2012). Esta forma da doença tornou-se rara devido à elevada taxa de proteção das cadelas, que através

da vacinação ou por exposição natural ao CPV, desenvolvem uma resposta imunitária humoral que transmitem aos cachorros através do colostro, impedindo assim a infecção neonatal (Greene & Decaro, 2012).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico precoce vai depender sobretudo do grau de suspeição clínica na presença de um animal com sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com a doença.

Existem testes rápidos, baseados em técnicas de ELISA, que detetam o antígeno em amostras fecais. Estes testes são frequentemente utilizados, na prática clínica, logo numa abordagem inicial, uma vez que representam um meio de diagnóstico rápido, económico, simples de executar e relativamente preciso. No entanto, têm algumas limitações, devido ao facto da duração da excreção viral ser muito variável, o que poderá dar origem a falso-negativos, ou à vacinação recente (2-14 dias), que poderá resultar em falso-positivos. A sensibilidade do *kit* rápido ronda os 77 a 80% (Crawford & Sellon, 2010).

A técnica de PCR que permite a deteção do genoma viral nas amostras fecais é um teste de diagnóstico com maior sensibilidade, conseguindo detetar mais de 90% dos animais infetados (Crawford & Sellon, 2010).

Testes de imunofluorescência indireta são utilizados para avaliar a quantidade de imunoglobulinas M e G anti-CPV, presentes, sendo que a deteção de IgM's indica infeção ativa. A vacinação recente pode interferir com o teste e dar origem a falso-positivos, sendo este um aspeto importante a considerar (Crawford & Sellon, 2010).

O teste da inibição da hemaglutinação (IH) é considerado o “*gold standard*” para a quantificação de anticorpos específicos para o CPV (Crawford & Sellon, 2010). Como o CPV tem a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies, se um animal for seropositivo, a capacidade de hemaglutinação viral será inibida devido à presença de anticorpos específicos (Day & Schultz, 2014).

1.6. Tratamento e Prognóstico

O tratamento desta doença é baseado, sobretudo, na terapêutica de suporte que inclui: fluidoterapia (suplementada com base nos *deficits* eletrolíticos, se necessário), antieméticos, nutrição entérica (tão cedo quanto possível), antibioterapia, controlo da dor e monitorização constante (Bird & Tappin, 2013). Em caso de anemia, pode-se também realizar transfusão de plasma, de glóbulos vermelhos ou de sangue total, como tratamento adjuvante (Crawford & Sellon, 2010). Também está descrito o uso do interferão ómega recombinante de origem

felina, pois parece reduzir a mortalidade e os sinais clínicos associados à enterite causada pelo CPV (Martin *et al.*, 2002; Bird & Tappin, 2013).

A taxa de mortalidade em cães com gastroenterite grave por CPV, e sem tratamento, é maior que 90% (Bird & Tappin, 2013). No entanto, quando a doença é reconhecida atempadamente e a terapêutica de suporte instituída o mais depressa possível, a taxa de sobrevivência pode rondar os 80 a 95% (Bird & Tappin, 2013). Machado (2016), reportou uma taxa de sobrevivência de 82,1% em cães hospitalizados na UIDI no período de 2013 a 2016.

1.7. Prevenção

A prevenção é realizada sobretudo através da vacinação e isolamento de animais doentes, mas também através da informação que é transmitida ao tutor de um cachorro, na altura da primeira consulta.

A vacina que protege contra o CPV é uma vacina nuclear que faz parte dos protocolos vacinais utilizados em Portugal.

No caso do CPV, são recomendadas vacinas vivas atenuadas (VVA's) de título elevado para viabilizar a eficácia da resposta imunitária na presença de anticorpos maternos (AcM's) (Crawford & Sellon, 2010).

A vacinação de pelo menos 70% dos indivíduos de uma população é a meta a alcançar para reduzir a prevalência de uma doença infecciosa. Contudo, para uma enterite provocada pelo CPV, em que o agente infeccioso é muito resistente no ambiente e é excretado em grandes quantidades, a taxa de cobertura dos programas vacinais, para prevenir a ocorrência de surtos, deverá ser superior (Greene & Decaro, 2012).

Como tal, todos os cachorros devem ser vacinados e permanecer num ambiente seguro até que o protocolo de primovacinação esteja concluído.

Este vírus é inativado pelo peróxido de hidrogénio ou pelo peroximonosulfato de potássio, sendo resistente aos desinfetantes comuns de amónio quaternário (Crawford & Sellon, 2010).

Um bom isolamento dos animais infetados e a correta limpeza e desinfecção dos espaços são procedimentos cruciais para quebrar o ciclo de transmissão do agente, principalmente em abrigos e em ambientes hospitalares (Crawford & Sellon, 2010).

2. Esgana Canina

2.1. Etiologia

O vírus da esgana canina (CDV) faz parte do género *Morbilivirus* que pertence à família *Paramyxoviridae* (Greene & Vandeveld, 2012; Sykes, 2014). O CDV é um vírus ARN com envelope, sendo por isso sensível às condições ambientais, nomeadamente aos raios ultravioletas. É bastante suscetível a ambientes quentes e secos, sendo destruído a temperaturas entre os 50°C e os 60°C durante 30 minutos (Greene & Vandeveld, 2012).

2.2. Epidemiologia

Este vírus infeta naturalmente o cão e várias espécies de mamíferos terrestres que atuam como hospedeiros reservatório (Greene & Vandeveld, 2012), contribuindo para a permanência do vírus no meio ambiente. É o caso da raposa, lobo, coiote, furão, doninha, lontra, marta, guaxinim, panda e também alguns felídeos selvagens (Sykes, 2014).

A sua transmissão ocorre sobretudo através das secreções nasais e oculares de animais doentes, por contacto direto ou aerossóis (Greene & Vandeveld, 2012). Todavia, o CDV pode ser isolado da maioria dos tecidos e secreções corporais, sendo que as secreções do animal (corrimento nasal, saliva, fezes e urina) devem ser consideradas produtos virulentos com capacidade infecciosa (Ferreira & Ferreira, 1990).

O contacto direto entre animais saudáveis e animais infetados é muito importante para a manutenção da transmissão viral. Os cães infetados representam uma séria ameaça para as populações de animais selvagens suscetíveis, podendo levar a surtos epidémicos catastróficos com elevadas taxas de mortalidade (Sykes, 2014).

Quando está presente nas secreções ou nos tecidos de animais doentes, o CDV sobrevive durante 1 hora a 37°C ou 3 horas a 20°C. Os procedimentos padrão de desinfecção realizados nos centros de atendimento médico veterinário (CAMV's) são, geralmente, eficazes na sua destruição (Greene & Vandeveld, 2012).

A transmissão transplacentária também pode ocorrer em cadelas gestantes, durante o período de virémia (Greene & Vandeveld, 2012).

O período de incubação do CDV é de 3 a 6 dias, e a excreção viral ocorre a partir do 7.º dia após inoculação experimental, podendo estender-se até 60 a 90 dias após infeção (Greene & Vandeveld, 2012).

2.3. Patogenia da infecção

Após a exposição oro-nasal, o vírus infeta os monócitos presentes no tecido linfóide do trato respiratório superior e tonsilas, onde se replica, sendo posteriormente disseminado, através da via linfática e sanguínea, para todo o sistema reticuloendotelial. A hemaglutinina viral liga-se a uma molécula presente na superfície das células do hospedeiro, conhecida como molécula sinalizadora de ativação linfocítica (MSAL). Esta molécula é uma glicoproteína membranária, que vai permitir a entrada do CDV nas células. A MSAL expressa-se nos tímocitos imaturos, linfócitos ativos, macrófagos e células dendríticas (Sykes, 2014).

A infecção pelo CDV pode levar a doença multisistêmica grave, afetando o sistema gastrointestinal, respiratório e neurológico (Sykes, 2014).

Normalmente, o vírus é excretado durante 1 a 2 semanas após doença aguda sistêmica, porém, os animais que desenvolvem sinais neurológicos, podem excretar o vírus de forma intermitente para o resto da vida (Greene & Vandeveld, 2012).

2.4. Sinais clínicos

Os sinais clínicos variam bastante e são altamente dependentes do subtipo viral, idade do animal e do seu estatuto imunitário (Greene & Vandeveld, 2012), bem como da presença de infecções virais ou bacterianas concomitantes (Sykes, 2014).

Estima-se que, mais de 50% das infecções causadas pelo CDV sejam subclínicas (Greene & Vandeveld, 2012).

Cães com sinais respiratórios podem desenvolver apatia, diminuição do apetite, tosse não produtiva, conjuntivite e descarga ocular e nasal bilateral de consistência serosa.

No caso de infecção bacteriana concomitante, surgem outros sinais associados à broncopneumonia como tosse produtiva, febre, letargia, taquipneia e a secreção oculo-nasal passa a ser mucopurulenta (Sykes, 2014).

A destruição viral do epitélio gastrointestinal resulta em inapetência, vômito, diarreia, desidratação e alterações eletrolíticas (Sykes, 2014).

Os cães que desenvolvem uma resposta imunológica tardia podem recuperar da doença aguda, mas falham na eliminação completa do vírus. Isto pode levar ao aparecimento de manifestações crônicas da doença que envolvem a úvea, órgãos linfoides, almofadinhas plantares e, sobretudo o sistema nervoso central (SNC) (Sykes, 2014). Mais de 30% dos cães infectados desenvolvem sinais neurológicos que, frequentemente evoluem para a

cronicidade. Aqueles que recuperam podem ficar com sequelas neurológicas residuais para toda a vida (Sykes, 2014).

As complicações neurológicas da infecção pelo CDV são as que mais influenciam o prognóstico e recuperação do animal (Greene & Vandeveld, 2012). Estas complicações variam consoante a área do SNC envolvida. Hiperestesia e rigidez cervical ou paraespinal podem verificar-se como resultado de meningite, não sendo no entanto muito comuns. Convulsões, sinais vestibulares e cerebelares, paraparésia, tetraparésia, ataxia e mioclonias são sequelas mais comuns (Greene & Vandeveld, 2012).

Os sinais oculares de infecção persistente pelo CDV incluem uveíte, coriorretinite, queratoconjuntivite seca, queratite e neurite ótica que poderá, ou não, estar associada a cegueira (Sykes, 2014). Outras complicações podem ser identificadas como hiperqueratose do plano nasal e das almofadinhas plantares, retenção ou erupção parcial de dentes e hipoplasia do esmalte, ocorrendo esta última em cães jovens, infetados com o CDV antes da erupção da dentição definitiva (Sykes, 2014).

Em relação aos achados laboratoriais é comum observar anemia e linfopénia. Pode também ocorrer neutropénia, monocitopénia e trombocitopénia, no entanto, neutrofilia com desvio à esquerda também poderá estar presente.

Nas análises bioquímicas, as alterações são inespecíficas e incluem alterações eletrolíticas decorrentes de vômito e diarreia, como hiponatremia, hipocaliémia e hipoclorémia (Sykes, 2014). O proteinograma apresenta diminuição da albumina e aumento das α - e γ -globulinas.

Cachorros infetados na fase neonatal demonstram hipoglobulinémia marcada devido à imunossupressão persistente causada pela infecção viral (Greene & Vandeveld, 2012).

2.5. Diagnóstico

Tal como no CPV, o diagnóstico vai depender muito do grau de suspeição clínica na presença de um quadro clínico compatível com a doença. Quando o cão apresenta todos os sinais clínicos típicos da doença, o diagnóstico é alcançado mais prontamente. Sendo que o diagnóstico *antemortem* de casos que apresentem apenas uma das formas da doença é mais desafiante e difícil de alcançar (Sykes, 2014).

Várias técnicas laboratoriais podem ser utilizadas para chegar ao diagnóstico definitivo. No entanto, nem sempre estão disponíveis ou são morosas.

Para deteção do antígeno a partir de amostras de sangue, fezes, zaragatoa nasal ou conjuntival pode-se recorrer a técnicas de imunofluorescência, ELISA e PCR.

Para medição de anticorpos utilizam-se testes serológicos, como ELISA ou seroneutralização (SN) (Sykes, 2014), no entanto a vacinação pode dar origem a falso-positivos. A SN é o teste considerado "*gold standard*" para avaliar o título de anticorpos existente (Greene & Vandeveld, 2012).

Existe ainda a possibilidade de recorrer às técnicas de imunohistoquímica como diagnóstico, mas para isso, é necessário fazer biópsias da mucosa nasal, do epitélio das almofadinhas plantares ou da pele localizada na região dorsal do pescoço (Greene & Vandeveld, 2012).

A esgana canina deve sempre ser considerada como um diagnóstico diferencial, em cães jovens com sinais neurológicos, mesmo que os sinais respiratórios ou gastrointestinais estejam ausentes (Sykes, 2014).

2.6. Tratamento e Prognóstico

O tratamento é inespecífico e a presença de sinais neurológicos graves incompatíveis com a vida é critério para se realizar eutanásia (Greene & Vandeveld, 2012; Sykes, 2014). Os tutores dos animais devem ser alertados para o facto de que mesmo que recuperem sem sequelas visíveis, estas alterações poderem aparecer mais tarde e que, ao contrário dos sinais sistémicos, os sinais neurológicos são geralmente irreversíveis (Greene & Vandeveld, 2012). A agravar este cenário, estes cães ao excretar o vírus contribuem para a contaminação do meio ambiente e, conseqüentemente para a ocorrência de casos secundários e de surtos epidémicos.

Alguns cães com sintomatologia ligeira podem recuperar espontaneamente sem tratamento. No entanto, nos casos em que ocorra doença respiratória e intestinal grave, muitas vezes é necessário recorrer a hospitalização e tratamento com fluidoterapia endovenosa (EV), oxigenoterapia, nebulizações e antimicrobianos de largo espectro para combater pneumonias bacterianas secundárias (Sykes, 2014). Também poderá ser necessária a introdução de antieméticos, lágrima artificial para cães com queratoconjuntivite seca ou a realização de lavagem transtraqueal ou broncoalveolar para testar a sensibilidade aos antibióticos, caso o tratamento para a pneumonia não surta efeito. A alimentação entérica deve ser iniciada o mais cedo possível e está descrito que a suplementação com vitaminas pode ser vantajosa, nomeadamente com vitamina B, utilizada não só para suprir as carências vitamínicas mas também como estimulante do apetite (Greene & Vandeveld, 2012).

A terapêutica utilizada para controlar os sinais neurológicos é menos previsível (Greene & Vandeveld, 2012). Relaxantes musculares como as benzodiazepinas ou anti-epiléticos

como o levetiracetam, têm sido utilizados no controlo das mioclonias, com eficácia variável (Greene & Vandeveld, 2012).

Para o controlo das convulsões, é recomendado iniciar o tratamento com anticonvulsivos após o início da doença sistémica, se possível antes do animal exibir convulsões. Para tratamento do “*status epilepticus*”, utiliza-se diazepam por via EV ou transretal, já para um controlo preventivo e de manutenção recorre-se ao fenobarbital (Greene & Vandeveld, 2012).

2.7. Prevenção

A prevenção baseia-se sobretudo na vacinação contra o CDV (Greene & Vandeveld, 2012) mas também no isolamento de animais doentes, ou que ainda não tenham sido vacinados (Sykes, 2014).

A prática da vacinação tem reduzido substancialmente a incidência da doença clínica em muitas regiões, mas os surtos ainda ocorrem, principalmente em cães não vacinados (Greene & Vandeveld, 2012; Sykes, 2014). Em 2015-2016, na zona de Lisboa e Vale do Tejo registou-se a ocorrência de um surto epidémico (Machado, 2016).

O CDV continua a ter uma grande importância, principalmente nos locais onde existem muitos cachorros que ainda não disponham de um sistema imunitário competente, nomeadamente em abrigos ou canis de criadores (Sykes, 2014). Estes locais devem, por isso, manter práticas de higiene e desinfeção escrupulosas, uma vez que este vírus, sendo instável fora do hospedeiro, é facilmente inativado pelos desinfetantes comuns na ausência de matéria orgânica (Sykes, 2014).

Os animais infetados são a principal fonte de contaminação e devem por isso ser separados dos animais saudáveis (Sykes, 2014).

A existência de hospedeiros reservatório, que excretam o vírus durante toda a vida, dificulta o controlo do CDV numa população.

3. Imunidade

3.1. Sistema imunitário

O sistema imunitário (SI) dos mamíferos consiste numa rede complexa de interações bioquímicas, celulares e moleculares, que atuam de forma simultânea e têm como objetivo o reconhecimento e destruição do microrganismo invasor (Tizard, 2013).

Este sistema, altamente desenvolvido e complexo, evoluiu no sentido de otimizar a capacidade de neutralização eficaz dos agentes patogénicos, que possam entrar em contacto com o animal. Para além de estar envolvido, direta e intrinsecamente, nos processos de inflamação e de reparação tecidular do organismo, o SI está também apto para responder face ao aparecimento de células neoplásicas ou células estranhas ao organismo, como ocorre por exemplo, no caso da rejeição de transplantes de órgãos (Day & Schultz, 2014).

A utilização de diferentes mecanismos de defesa em simultâneo, permite aumentar a eficácia do SI na proteção contra os agentes infecciosos, prevenindo assim infeções graves.

Um sistema biológico, tão potente como este, requer uma série de mecanismos de regulação que garantam que a resposta imunitária seja travada quando deixa de ser necessária (Day & Schultz, 2014).

Ocasionalmente, a homeostasia do sistema imunitário pode apresentar falhas, originando respostas inapropriadas a antigénios inócuos presentes no ambiente, na dieta ou no próprio organismo. Estas alterações levam ao aparecimento de uma variedade de doenças imunomediadas que despoletam reações de hipersensibilidade e autoimunidade (Day & Schultz, 2014).

São várias as células que fazem parte do sistema imunitário dos mamíferos, sendo os linfócitos e os plasmócitos as mais importantes do ponto de vista imunológico (Day & Schultz, 2014).

Os linfócitos podem ser classificados em linfócitos B ou linfócitos T. Os linfócitos B derivam das células estaminais presentes na medula óssea (Day & Schultz, 2014). A sua maturação ocorre na medula óssea e nas placas de Peyer, presentes no íleo (Day & Schultz, 2014).

Os plasmócitos constituem uma fase de diferenciação avançada dos linfócitos B, sendo responsáveis pela síntese de imunoglobulinas, fundamentais na resposta imunitária humoral (Day & Schultz, 2014).

Os linfócitos T são as células responsáveis pela resposta imunitária mediada por células (Tizard, 2013; Day & Schultz, 2014), e o seu processo de maturação final decorre no timo.

Os órgãos linfoides podem ser primários ou secundários. É nos órgãos linfoides primários (medula óssea, placas de Peyer e timo) que ocorre a formação e maturação inicial das células linfoides. Já nos secundários (linfonodos, baço e tecido linfático associado à mucosa), localizam-se os linfócitos maduros, capazes de participar numa resposta imunitária (Day & Schultz, 2014).

De acordo com o seu nível de diferenciação, os linfócitos podem ser células virgem ou de memória. Sendo que, ao contrário das células de memória, as células virgem nunca contactaram com um antígeno (Day & Schultz, 2014).

As células linfoides não são estáticas nem exclusivas de uma determinada localização no tecido linfático, pelo contrário, elas movimentam-se permanentemente, através da circulação sanguínea e linfática, assegurando uma vigilância imunitária constante de todo o organismo (Day & Schultz, 2014).

Existem dois tipos distintos de resposta do SI ao antígeno: a resposta inata e a adquirida, que serão discutidas adiante.

3.1.1. Antígeno

Um antígeno (Ag) é uma substância considerada estranha ao organismo, capaz de se ligar a um anticorpo e assim, despoletar ou não uma reação imunitária. Alguns Ag's não estimulam a produção de anticorpos, como parte da resposta imunitária do hospedeiro (Day & Schultz, 2014).

Um único Ag pode conter vários epítomos, cada um capaz de induzir resposta imunitária, no entanto, alguns poderão ter maior afinidade para o anticorpo que outros (Day & Schultz, 2014).

Os Ag's mais imunogénicos são, normalmente, moléculas insolúveis e de grandes dimensões (peso molecular > 10kD) que possuam uma estrutura tridimensional estável e alguma complexidade do ponto de vista bioquímico (Day, 2012^a; Day & Schultz, 2014).

A capacidade imunogénica de um antígeno pode ser potenciada através da utilização de substâncias adjuvantes, nomeadamente alumínio, que induzem uma reação imunitária não específica e promovem a libertação lenta do Ag (Day, 2012^a).

3.1.2. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig's) são glicoproteínas, vulgarmente denominadas por anticorpos, que desempenham um papel fundamental na resposta imunitária. Estas moléculas, produzidas pelos plasmócitos, ligam-se ao antígeno formando o complexo Ag-Ac (Day & Schultz, 2014; Greene & Levy, 2012).

Existem cinco classes diferentes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD; por ordem decrescente de abundância. O período de semi-vida é de aproximadamente 14 dias (Day, 2012^a), no entanto, as imunoglobulinas da classe A degradam-se mais rapidamente, seguidas pelas IgM's e, por fim, as IgG's (Peterson & Kutzler, 2011; Greene & Levy, 2012).

Num cachorro, as Ig's endógenas tendem a aumentar pela seguinte ordem: primeiro as IgM's, depois as IgG's e por fim as IgA's; alcançando os valores normais de um cão adulto aos 2-3 meses, 6-9 meses e 12 meses, respetivamente (Peterson & Kutzler, 2011).

As IgG's são produzidas no baço, linfonodos e medula óssea, sendo o subtipo que se encontra em maior concentração no sangue, desempenhando um papel fundamental na defesa mediada por Ac's (Peterson & Kutzler, 2011). Devido ao seu tamanho reduzido (180KDa), as IgG's conseguem atravessar a parede dos vasos sanguíneos mais facilmente que as outras imunoglobulinas. As imunoglobulinas da classe G difundem-se rapidamente para o espaço extravascular (Peterson & Kutzler, 2011; Day, 2012^a), participando na defesa dos tecidos e superfícies corporais.

As IgM's são também produzidas nos órgãos linfoides secundários e, ao contrário das IgG's, o seu tamanho não permite atravessar os capilares sanguíneos (Peterson & Kutzler, 2011). Estas moléculas são constituídas por cinco unidades básicas, unidas entre si, o que significa que cada molécula de IgM contém dez locais de ligação ao Ag (Day, 2012^a). São, por isso, mais eficientes que as IgG's, no que diz respeito à ativação do complemento, opsonização, neutralização do vírus e aglutinação (Peterson & Kutzler, 2011).

As imunoglobulinas da classe M são produzidas sobretudo durante uma resposta imunitária primária, estando também presentes numa resposta secundária. Contudo, a sua presença é mascarada devido à predominância de IgG (Peterson & Kutzler, 2011).

As IgA's são produzidas pelos plasmócitos que estão localizados na mucosa intestinal, respiratória e urinária, na pele e na glândula mamária. Estas moléculas são transportadas através das células epiteliais e vão ligar-se a um componente secretor, formando um complexo, que protege a glicoproteína da digestão enzimática pelas proteases intestinais (Day & Schultz, 2014).

As Ig's da classe A têm um papel fundamental no desenvolvimento da imunidade local, contribuindo para a defesa do trato gastrointestinal, respiratório e urinário, como também da glândula mamária e olhos, contra os agentes invasores (Peterson & Kutzler, 2011).

As IgE's estão presentes em baixas concentrações no sangue e, tal como as IgA's, são produzidas pelos plasmócitos presentes nas mucosas, contribuindo para a defesa local. Esta classe de Ig's vai ligar-se a recetores presentes à superfície dos mastócitos e basófilos, desencadeando uma reação inflamatória aguda que vai ajudar à eliminação do agente (Peterson & Kutzler, 2011; Day, 2012^a). Esta é a classe de anticorpos com o menor tempo de semivida, sendo também muito sensível ao calor (Peterson & Kutzler, 2011). Muitas vezes o seu aumento está relacionado com infeções parasitárias intestinais (Peterson & Kutzler, 2011; Day, 2012^a; Day & Schultz, 2014).

As IgD's existem numa quantidade muito inferior às outras classes de imunoglobulinas (Peterson & Kutzler, 2011), encontrando-se predominantemente à superfície dos linfócitos B imaturos (Day, 2012^a).

3.2. Imunidade inata e Imunidade adquirida

O SI recorre a várias estratégias para que a defesa do organismo seja bem-sucedida.

A resposta do sistema imunitário pode ser classificada como inata ou adquirida. Na Tabela 1, encontra-se um resumo comparativo entre a resposta imunitária inata e a adquirida, que serão discutidas mais à frente.

A transição entre a imunidade inata e a adquirida, ocorre após a apresentação antigénica inicial, realizada através de células apresentadoras de Ag - células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Após este processo, é determinada a natureza da resposta imunitária adaptativa subsequente (Day, 2012^a; Day & Schultz, 2014).

Tabela 1 - Comparação entre imunidade inata e imunidade adquirida.

	Resposta inata Sempre ativa	Resposta adquirida Ativada por Ag
Células envolvidas	Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK	Linfócitos T e B
Início	Rápido (minutos a horas)	Lento (dias a semanas)
Especificidade	Microrganismos comuns	Ag únicos
Potência	Pode ser ultrapassada	Raramente é ultrapassada
Memória	Sem memória	Com memória significativa
Efetividade	Não altera	Melhora com exposição

3.2.1. Imunidade inata

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, que atua de forma inespecífica, baseando-se em várias estratégias.

A existência de barreiras físicas, como a pele intacta e mucosas (Tizard, 2013), dificulta a invasão microbiana.

A ação das células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), células NK inatas, mediadores inflamatórios e a ativação da via alternativa do complemento (Day, 2012^a), vão contribuir diretamente, ou para a destruição do invasor, ou para a produção de células específicas de defesa.

Também se considera parte integrante do sistema imunitário inato, um subgrupo particular de linfócitos T, que expressa um único recetor à superfície e está presente em elevadas quantidades nos locais que contactam com o exterior (Day, 2012^a).

Quando as barreiras físicas não são suficientes para controlar a invasão microbiana, é ativada uma resposta imunitária inespecífica, que dura apenas algumas horas e está direcionada para a rápida eliminação do microrganismo invasor (Tizard, 2013).

As superfícies corporais possuem mecanismos de defesa próprios que, numa primeira fase, ajudam a expulsar o agente. Estes mecanismos são: a tosse, espirros e a existência de um fluxo de muco, no caso do trato respiratório, e vômito e diarreia no caso do trato gastrointestinal.

A presença de bactérias comensais, tanto na pele como no intestino, também contribui para a defesa do organismo, uma vez que os microrganismos que fazem parte da microbiota

residente estão bem adaptados, competindo com os agentes potencialmente invasores, o que, na maior parte das vezes resulta na sua neutralização (Tizard, 2013).

A existência de imunidade inata, é essencial para que os agentes patogénicos não consigam invadir o organismo do hospedeiro, no entanto, esta não é totalmente eficaz.

3.2.2. Imunidade adquirida

A imunidade adquirida, ou adaptativa, é um sistema complexo de defesas, capaz de reconhecer e destruir microrganismos invasores e de registar o processo através da memória imunológica (Tizard, 2013).

Este tipo de resposta imunitária é mais lento num primeiro contacto mas, devido à capacidade de memória das células T e B, num contacto posterior com o Ag a resposta será mais eficiente e mais rápida. Quanto mais frequente for o contacto com determinado agente, mais eficaz é o SI na sua eliminação (Tizard, 2013).

3.2.3. Imunidade humoral *versus* imunidade celular

A imunidade humoral e a imunidade celular são duas subdivisões dentro da imunidade adquirida (Tizard, 2013).

A imunidade humoral é mediada por anticorpos sendo por isso, o principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelulares. Já a imunidade celular, é mediada por linfócitos e, envolve tipicamente destruição citotóxica das células-alvo, contribuindo para a redução da propagação da infeção.

A proteção contra agentes infecciosos virais envolve tanto uma forte imunidade humoral, como também uma imunidade celular consistente. Por essa razão, não é possível correlacionar totalmente a presença ou ausência de anticorpos com a resistência ou suscetibilidade do animal a uma determinada infeção viral (Jensen *et al.*, 2015).

3.3. Imunidade passiva

A imunidade passiva de origem materna, é transferida principalmente pela ingestão de colostro rico em imunoglobulinas, sendo um componente vital para a proteção imunitária dos neonatos, uma vez que, ajuda a prevenir doenças numa fase em que os cachorros ainda são imaturos do ponto de vista imunitário (Greene & Levy, 2012). A concentração de Ig's no colostro está, por isso, dependente da titulação de Ac's da progenitora.

As primeiras 24 horas são cruciais para que o cachorro adquira imunidade a partir da progenitora, através da ingestão de colostro rico em Ig's (Day, 2007). É por isso necessário

que o cachorro comece a mamar o mais cedo possível, pois é no colostro que estão presentes elevadas concentrações de AcM's.

Esta transferência de imunidade só é possível devido a dois mecanismos que permitem a absorção intestinal de Ac's de origem materna, diretamente para a circulação sanguínea: (1) baixa concentração de enzimas intestinais proteolíticas (Day, 2007); (2) expressão transitória de recetores membranares presentes no epitélio intestinal, que facilitam o transporte das Ig's para a circulação sanguínea (Greene & Levy, 2012) e linfática (Day, 2007). Este processo de absorção, ocorre no duodeno e jejuno do cachorro, sendo a sua eficiência máxima durante o primeiro dia de vida. Também ocorre transferência de imunidade durante todo o período de amamentação, embora em concentrações muito inferiores (Greene & Levy, 2012).

Após o período de absorção, a concentração de Ac's de origem materna decai gradualmente com o passar do tempo (Mila *et al.*, 2014), sendo que a velocidade deste declínio, é tanto maior quanto maior for o ritmo de crescimento do cachorro (Chappuis, 1998; Day 2007; Peterson & Kutzler, 2011).

Se por um lado, a aquisição de imunidade através da mãe é um processo essencial, cuja falha pode rapidamente levar a uma infeção neonatal e, muitas vezes, culminar na morte do animal, por outro lado, a presença de elevadas concentrações de Ac's maternos pode neutralizar o Ag vacinal, impedindo o desenvolvimento de uma resposta imunitária endógena (Tizard & Ni, 1998; Day, 2007). Isto porque a produção endógena de Ac's só é iniciada quando os níveis de Ac's maternos em circulação diminuem abaixo de um limiar específico. Este limiar não tem um valor absoluto, sendo determinado pelo rácio entre o nível de Ac's de origem materna e o volume de antígeno, vacinal ou patogénico, que contacta com o animal (Greene, & Levy 2012).

Os animais privados de colostro, aumentam gradualmente o nível de Ig's endógenas até que, a determinada altura, igualam o valor de animais que receberam Ac's durante a amamentação. Cachorros que não ingeriram colostro não receberam Ac's passivamente através da progenitora, e por essa razão estão aptos a responder eficazmente à vacinação, logo a partir das 2 semanas de idade (Toman *et al.*, 2002 em Day, 2007).

A transferência passiva de imunidade pode também ser realizada com fins terapêuticos, permitindo uma recuperação mais rápida de animais doentes, através da administração de fatores humorais ou celulares obtidos a partir de um dador previamente sensibilizado (Greene & Levy, 2012).

3.3.1. Anticorpos maternos

Nos cães, apenas 2 a 18% dos anticorpos maternos (AcM's) é transferido para o feto antes do nascimento (Greene & Levy, 2012). Isto ocorre porque a placenta do cão, sendo do tipo endotelio-corial, atua como uma barreira, o que impossibilita a transferência transplacentária de quantidades consideráveis de AcM (Day, 2007).

Assim, um recém-nascido possui apenas cerca de 5% da concentração de IgG's presente num cão adulto (Day, 2007) sendo que, esta pequena quantidade de AcM's vai conferir proteção apenas por um curto período de tempo após o nascimento.

O título de AcM's, adquirido inicialmente a partir do colostro, pode atingir 77% do título de Ac's da progenitora (Greene & Vandeveld, 2012).

Segundo Heddle & Rowley (1975) citados por Day (2007), o colostro canino é bastante rico em imunoglobulinas G e A e, por vezes, estão presentes em concentrações superiores às aquelas encontradas no sangue da progenitora. Já o leite materno subsequente contém mais IgA's que IgG's, tal como é possível verificar na Tabela 2. Estas IgA's tornam-se na primeira linha de defesa do neonato contra infecções da mucosa intestinal e respiratória superior (Greene & Levy, 2012), isto porque as IgA's são altamente eficazes em inibir a aderência de agentes patogênicos à superfície da mucosa, neutralizando-os de imediato (Greene, 2012).

Tabela 2 - Concentração de imunoglobulinas no sangue da progenitora, no sangue do cachorro, no colostro e no leite materno (adaptado de Heddle & Rowley, 1975 in Day, 2007).

Concentração em mg/ml	Sangue progenitora	Colostro	Leite materno ^{a)}	Sangue cachorro ^{b)}	
IgG	5,2 – 17,3 (9,8)	15,68	0,098	23	
IgM	0,7 – 2,7 (1,7)	0,23	0,15	0,2	
IgA	0,2 – 1,2 (0,5)	2,5	1,35	0,45	<i>egend</i> a: a) Entre o dia

25 e 50 após o parto; b) 12 horas após ingestão de colostro.

Uma ingestão de imunoglobulinas eficaz, a partir do colostro, depende de vários fatores, nomeadamente do tamanho e vigor individual do recém-nascido, e da capacidade maternal da progenitora (Day, 2007).

Foi demonstrado que o nível de AcM's absorvido está associado com o tamanho da raça e com o ritmo de crescimento do animal, durante os primeiros 2 dias de vida. Isto é, às 48 horas de vida, os cachorros de raças grandes geralmente possuem títulos de AcM's

superiores aos cachorros de raças pequenas, o que pode estar associado ao facto de ingerirem maiores quantidades de colostro e de possuírem uma área de absorção intestinal superior. De acordo com Mila *et al.* (2014), durante os dois primeiros dias de vida, o título de AcM's será tanto maior quanto maior for o ritmo de crescimento do cachorro, uma vez que o ritmo de crescimento vai estar diretamente associado ao consumo de leite materno.

O tempo de semi-vida das Ig's de origem materna varia, consoante os autores, entre 8 e 13 dias (Pollock & Carmichael, 1982; Day, 2007; Day, 2014; Mila *et al.*, 2014). No entanto, o momento exato em que o título de AcM's decai para níveis indetetáveis, vai depender do título de AcM's que o neonato adquiriu inicialmente através do colostro.

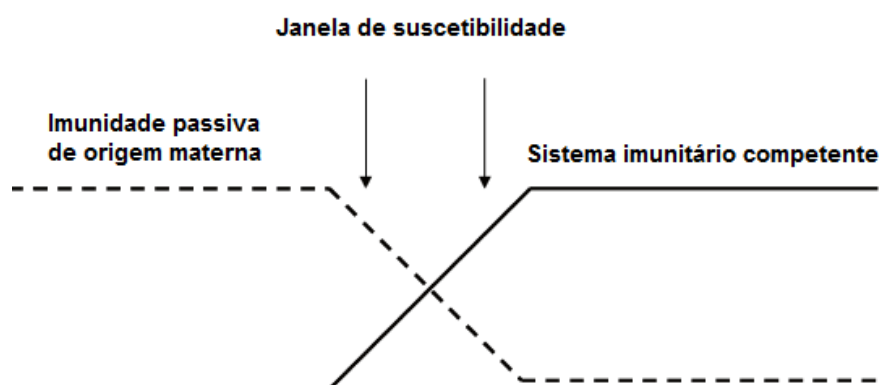
Na maioria dos cães a imunidade passiva decai entre as 8 e as 12 semanas de idade (Day *et al.*, 2014), embora os AcM's anti-CDV pareçam decair para níveis não significativos por volta das 10-12 semanas de idade (Chappuis, 1998). Já os AcM's anti-CPV tendem a persistir durante mais tempo e podem, em certos casos, interferir com a vacinação entre as 13 e as 14 semanas de idade (Pollock & Carmichael, 1982; Decaro *et al.*, 2005).

Uma vez que os AcM's podem interagir com o antigénio bloqueando-o, sabe-se que é vantajoso utilizar uma dose superior de antigénio vacinal, na tentativa de esgotar os AcM's existentes, e possibilitar dessa forma a imunização precoce na presença de AcM's (Greene & Levy, 2012). Vários estudos demonstraram que um em cada dez cachorros com 12 semanas de idade ainda possui um título de AcM's capaz de anular a vacinação (Day, 2014).

Para além disto, existe um mecanismo de *feedback* que inibe a produção endógena de IgG's na presença de AcM's (Greene & Levy, 2012) e, à medida que o título de AcM's vai diminuindo, o animal torna-se mais vulnerável aos organismos presentes no ambiente, iniciando a síntese das suas próprias imunoglobulinas. Este fenómeno contribui para a existência de um período de tempo denominado "janela de suscetibilidade" (Figura 1) em que, nem os títulos de AcM's, nem a produção endógena de Ac's, são suficientes para prevenir a infeção (Morein *et al.*, 2002). Os organismos patogénicos têm a capacidade de esgotar mais AcM's que os organismos atenuados, presentes em vacinas vivas (Greene & Levy, 2012).

Normalmente este período de suscetibilidade ocorre entre as 8 e as 10 semanas de vida do cão. Porém, a utilização de vacinas com títulos elevados, na vacinação das progenitoras, vai aumentar a concentração de AcM's transferidos que por sua vez vão persistir durante mais tempo, prolongando também a janela de suscetibilidade (Day, 2014). De acordo com o Professor Ronald Schultz, a janela de suscetibilidade é superior para o CPV relativamente a qualquer outro vírus (Smith, 1995).

Figura 1 - Janela de suscetibilidade aos agentes infecciosos que circulam numa população (adaptado de Morein et al., 2002).



3.4. Imunoprofilaxia

A imunoprofilaxia baseia-se no estabelecimento de uma resposta imunitária, ativa e específica, após exposição vacinal. Uma vez estimulado, o sistema imunitário do animal deverá ser capaz de promover proteção contra esse agente infeccioso, e neutralizá-lo prontamente num eventual contacto posterior. A resposta imunitária é induzida através da administração de vacinas que podem conter microrganismos, os seus constituintes, ou os seus subprodutos metabólicos (Greene & Levy, 2012).

Devido à pequena variação de antígenos presentes à superfície dos vírus e bactérias, a imunoprofilaxia é um procedimento bastante bem sucedido na prevenção de doenças provocadas por estes microrganismos. O mesmo não acontece quando se trata de doenças causadas por outros agentes, nomeadamente fungos, protozoários, metazoários patogénicos, pois estes contêm determinantes antigénicos mais complexos que, tornam a imunoprofilaxia difícil de realizar (Greene & Levy, 2012).

As medidas de imunoprofilaxia devem ser adaptadas, não só aos cenários epidemiológicos locais, como também às exigências de cada indivíduo. Desta forma, os criadores devem ser encorajados a registar as informações relevantes para a avaliação indireta do nível de imunidade passiva, nomeadamente: (1) verificar quais os cachorros que mamaram nas primeiras 12 horas de vida; (2) pesar sistematicamente cada cachorro nos primeiros dias de vida (Mila et al., 2014).

Com base nestas informações, o médico veterinário deverá definir qual a melhor altura para iniciar a vacinação de cada animal.

3.5. Duração da imunidade

Desde meados dos anos 70, que a comunidade científica tem investigado a duração da imunidade (DI) conferida pelas vacinas disponíveis para os animais de companhia.

Conhecer a DI é muito importante para se definir um intervalo de tempo adequado entre as revacinações, sendo o principal objetivo, vacinar apenas o número de vezes necessário para que o animal se mantenha protegido (Day *et al.*, 2016).

O método mais rigoroso para avaliar a DI é a realização da contraprova virulenta. Para isso, é necessário recorrer a animais SPF (Specific Pathogen Free), sem AcM's, que sejam vacinados e posteriormente mantidos em isolamento, pelo período de tempo previamente estabelecido. Após este período, realiza-se a contraprova virulenta a partir da qual se verifica o estatuto imunitário do animal (Greene & Levy, 2012). Estes testes são muito dispendiosos e demorados.

Uma imunidade duradoura vai depender sobretudo da estimulação de uma resposta eficaz, por parte do sistema imunitário do animal, na altura da vacinação (Litster *et al.*^a, 2012).

A duração da imunidade pós-vacinal depende de muitas variáveis como o tipo de vacina utilizado, o seu nível de eficácia, a capacidade do animal em montar uma resposta imunitária efetiva e a qualidade do procedimento (Almendra *et al.*, 2005).

A DI está também dependente da ocorrência de dois mecanismos essenciais: (1) a persistência das células B e T estimuladas na altura da infeção/vacinação; (2) a persistência de plasmócitos de vida longa que, continuam a produzir Ac's durante anos após a estimulação inicial (Schultz, 2006).

No geral:

- 1) Vacinas virais induzem uma DI superior às vacinas bacterianas;
- 2) As VVA's induzem uma DI superior à DI conferida por vacinas mortas (Schultz, 2006);
- 3) A DI após infeção natural, será sempre igual ou superior àquela que é alcançada através da vacinação (Schultz *et al.*, 2010).

Com base em vários estudos realizados, a duração da imunidade em cães vacinados contra o CDV é superior a 3 anos (Abdelmagid *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2004; Schultz, 2006; Greene & Vandeveld, 2012; Jensen *et al.*, 2015; Day *et al.*, 2016), podendo em alguns casos chegar aos 9 anos (Olson *et al.*, 1997; Schultz, 2006).

Para o CPV, a DI mínima registada é de 3 anos (Abdelmagid *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2004; Greene & Levy, 2012; Day *et al.*, 2016). No entanto, outros estudos demonstraram uma DI de 7 a 9 anos, em cães vacinados com vacinas polivalentes (Schultz, 2006).

Schultz *et al.* (2010) sugeriram que a DI é de pelo menos 9 anos em cães vacinados com vacinas vivas atenuadas contra infeções virais. Os 40 animais que foram incluídos no estudo foram mantidos em ambientes livres de CDV e CPV e, todos eles resistiram à contraprova virulenta, independentemente do título de Ac's presente.

Após uma infeção natural, presume-se que o animal permaneça imunizado para toda a vida, tanto no que diz respeito ao CDV como ao CPV (Coyne *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2010; Sykes, 2014). Desta forma, pode-se questionar se, a vacinação de animais que tenham recuperado destas doenças, não será uma medida contraproducente.

4. Vacinação

O objetivo da vacinação é aumentar a resistência de um indivíduo a determinada infeção, induzindo uma resposta imunitária contra o antigénio vacinal, semelhante àquela que ocorreria numa infeção natural (Strasser *et al.*, 2003).

Estima-se que, em países desenvolvidos, apenas 30 a 50% da população de animais de estimação seja vacinada, sendo este valor significativamente menor nas nações em desenvolvimento (Day *et al.*, 2016).

A vacinação de um indivíduo é importante para a sua proteção mas também tem um papel importante na redução de animais suscetíveis numa população e assim permite baixar a incidência da doença (Day *et al.*, 2016).

De acordo com Michael J. Day (2012), a vacina ideal deve cumprir os seguintes requisitos:

- a) Ser administrada pela mesma via em que ocorre a exposição natural;
- b) Ser prontamente identificada pelas células apresentadoras de antigénio;
- c) Ser capaz de induzir uma estimulação apropriada e funcional das populações de linfócitos B e T;
- d) Ser capaz de induzir memória de longo prazo.

4.1. Tipos de vacinas

As vacinas vivas atenuadas, tal como o seu nome indica, passam por um processo de atenuação que permite reduzir a virulência do antigénio, para que o animal não manifeste sinais da doença.

Os organismos modificados, presentes nas VVA's, apresentam-se intactos e viáveis, o que lhes permite induzir infeção, replicação viral e desencadear uma resposta imunitária

associada (Day, 2012^b; Decaro *et al.*, 2014; Day *et al.*, 2016). A sua atenuação é realizada através da adaptação do agente a condições atípicas de crescimento ou, através de passagens em culturas de células provenientes de espécies para as quais não esteja adaptado (Day, 2012^b).

As VVA's possuem várias vantagens quando comparadas com as vacinas mortas: (1) indução de uma resposta imunitária mais potente - são capazes de induzir infeção, a capacidade de replicação mantém-se e o antigénio rapidamente atinge os mesmos locais anatómicos de uma infeção natural, o que contribui para a indução de uma resposta imunitária celular; (2) os organismos vivos induzem a resposta desejada em concentrações muito inferiores; (3) geralmente não são necessários adjuvantes (Ford, 2010; Day, 2012^b).

No entanto também têm algumas desvantagens: (1) teoricamente existe a possibilidade destes vírus modificados reverterem a sua virulência; (2) há um risco superior para a ocorrência de possíveis efeitos adversos associados; (3) pode haver contaminação durante a produção; (4) apresentam menor estabilidade, o que normalmente exige uma cadeia fria de armazenamento (Day, 2012^b).

As vacinas mortas, ou inativadas, contêm o microrganismo morto, incapaz de infetar, replicar-se ou induzir doença. No entanto, como está intacto no que diz respeito aos antigénios que fazem parte da sua constituição, é capaz de estimular uma resposta imunitária no hospedeiro, apesar de esta ser mais fraca que a alcançada com as VVA's (Ford, 2010; Day, 2012^b; Day *et al.*, 2016).

Existem vários meios capazes de inativar o antigénio vacinal para produzir uma vacina morta. Os mais utilizados envolvem a inativação química recorrendo ao uso de substâncias como o formaldeído, álcool ou agentes alquilantes.

As vantagens da utilização deste tipo de vacinas são a sua estabilidade e o facto de a produção ser menos complexa.

Quanto às desvantagens, este tipo de vacina caracteriza-se por ser menos eficaz na indução da resposta imunitária (humoral e celular), e por ter um período de duração de imunidade mais curto, em comparação com as VVA's (Smith, 1995; Ford, 2010; Day *et al.*, 2016).

Estas vacinas inativadas, geralmente necessitam de adjuvantes na sua composição para aumentar a sua potência e, requerem múltiplas doses para induzir proteção, até mesmo no caso dos animais adultos (Ford, 2010; Day *et al.*, 2016). Estes adjuvantes potenciam

sobretudo a resposta imunitária Th2, que se caracteriza pela produção de anticorpos (Ford, 2010).

Sabe-se que algumas das reações vacinais estão associadas aos adjuvantes (Day, 2012^b). Os adjuvantes tradicionais não têm um efeito específico, estando a sua ação limitada à libertação lenta e controlada de antigénio, com tendência a induzir um foco de inflamação persistente que, na pior das hipóteses, poderá vir a tornar-se num granuloma (Day & Schultz, 2014). Os adjuvantes modernos têm um efeito mais direcionado para a resposta imunitária, nomeadamente os adjuvantes de citocinas. Por esta razão, as vacinas inativadas podem ser mais caras que algumas VVA's.

As vacinas recombinantes resultam da seleção genética de segmentos de ADN ou ARN, que são posteriormente transferidos de um vírus para o outro (Ford, 2010). Existe uma vacina recombinante contra a esgana que demonstrou ter a capacidade de induzir imunidade em cachorros mesmo na presença de AcM's (Ford, 2010), no entanto esta vacina não está disponível em Portugal.

Hoje em dia, na vacinação dos cães contra o CPV e o CDV tendem a utilizar-se VVA's. No caso do CPV, recorre-se a variantes do CPV-2, sendo que, todos os genótipos estão relacionados garantindo imunidade protetora contra todas as outras variantes, incluindo a estirpe CPV-2c, que foi a última variante a emergir na natureza.

Para a imunização contra o CDV, existem certas estirpes no mercado, que garantem proteção contra qualquer variante do vírus - este fenómeno denomina-se de imunidade cruzada (Day *et al.*, 2016).

As vacinas mortas e inativadas estão geralmente reservadas para utilização em animais selvagens ou exóticos (Appel & Summers, 1995), devido ao hipotético risco de reversibilidade das VVA's.

4.2. Vacinas nucleares, não-nucleares e não recomendadas

As vacinas são classificadas em nucleares ou não-nucleares, de acordo com a premência da sua administração.

Uma vacina nuclear é aquela que qualquer cão deve receber, independentemente da sua localização geográfica, no sentido de promover uma proteção contra os agentes infecciosos com relevância a nível global (Day *et al.*, 2016).

As vacinas nucleares são aquelas que conferem proteção para o CDV, CPV-2, adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e suas variantes (Day *et al.*, 2016). No entanto, em determinados

países, pode ser necessário acrescentar vacinas a este grupo. Como é o caso da vacina contra a raiva que, mesmo em países oficialmente livres da doença, como é o caso de Portugal, esta vacina é obrigatória por lei como medida preventiva. Estas medidas visam proteger não só a população animal como também a população humana, no caso da reentrada do vírus no país.

As vacinas não-nucleares são aquelas cujo uso é determinado com base na localização geográfica, e nos riscos de exposição de cada indivíduo, ponderando o risco-benefício. Exemplo, a vacina contra a parainfluenza canina e *Bordetella bronchiseptica*, vulgo tosse do canil (Day *et al.*, 2016).

As vacinas não recomendadas não reúnem evidência científica consistente para que a sua utilização seja considerada segura e eficaz. Por exemplo, a vacina para o coronavírus canino (Day *et al.*, 2016).

4.3. Vacinas polivalentes e monovalentes

Uma vacina polivalente possui na sua composição diferentes antígenos vacinais, sendo, por isso, ideal para a administração de vacinas nucleares. Porém para as vacinas não-nucleares é mais vantajosa a utilização de vacinas monovalentes, para que o clínico consiga gerir planos vacinais individuais, evitando estimulações imunitárias desnecessárias (Day *et al.*, 2016).

A existência de diferentes antígenos num só produto não afeta negativamente a eficácia do mesmo, porém, a estimulação desmedida do sistema imunitário pode contribuir para o aparecimento de doenças autoimunes (Day *et al.*, 2016).

As vacinas polivalentes têm a vantagem de permitir a inoculação de vários Ag's vacinais, apenas com uma injeção. No entanto, esta situação poderia ser facilmente ultrapassada se as vacinas monovalentes fossem miscíveis entre si.

Em Portugal, as vacinas polivalentes são amplamente utilizadas. Na Tabela 3, estão discriminadas as combinações de vacinas disponíveis em Portugal.

Tabela 3 - Combinações de vacinas disponíveis em Portugal.

MONOVALENTES	POLIVALENTES
<ul style="list-style-type: none"> ○ Parvovírus canino ○ Raiva ○ Leptospiroses caninas ○ Parainfluenza canina ○ Babesiose 	<ul style="list-style-type: none"> ○ DP (Esgana+Parvovírus) ○ DHL (Esgana+Adenoviroses+Leptospirose) ○ DHPL (Esgana+Adenoviroses+Parvovírus+Leptospirose) ○ DHPLR (Esgana+Adenoviroses+Parvovírus+Leptospirose+Raiva) ○ DHPPi (Esgana+Adenoviroses+Parvovírus+Parainfluenza) ○ DHPPiL (Esgana+Adenoviroses+Parvovírus+Parainfluenza+Leptospirose)

O ideal seria existirem vacinas monovalentes para os vários agentes infecciosos, no sentido de ser possível criar um protocolo vacinal específico para as necessidades de cada animal, seguindo assim as recomendações da World Small Animal Veterinary Association (WSAVA).

Em Portugal, seria necessário acrescentar à oferta do mercado, uma vacina monovalente contra o vírus da esgana e outra contra o adenovírus canino. Só assim seria possível vacinar de acordo com a necessidade individual de cada cão, isto é, se um cão só se apresentasse desprotegido contra o CDV, apenas seria necessário administrar a vacina com valência para esse agente.

4.4. Calendário Vacinal

Apenas será dada relevância às vacinas nucleares com valência para os agentes abordados nesta dissertação, ou seja, o CDV e o CPV.

No passado, os protocolos vacinais, adotados pela maioria dos médicos veterinários de animais de companhia, eram baseados sobretudo nas indicações dadas pelo fabricante. Essas indicações foram fundamentadas com base nos testes necessários para o licenciamento do produto vacinal. Testes esses, que tiveram durações relativamente curtas (1-2 anos), devido aos custos associados à manutenção de animais isolados por longos períodos de tempo (Ottiger et al., 2006). Como não foi necessário garantir imunidade para além desse período, os fabricantes definiram uma DI de 1 ano, representando um valor mínimo e não a DI real da vacina (Day *et al.*, 2016).

Em 2006, foi criado o Grupo de Diretrizes de Vacinação (VGG) da WSAVA, constituído por especialistas independentes, com o objetivo de emitirem diretrizes de vacinação globais para cães e gatos.

As primeiras diretrizes da WSAVA foram publicadas em 2007, sendo que em 2010 foram atualizadas, tendo sido redigido um documento dirigido aos tutores e aos criadores de cães e gatos.

Mais recentemente, em 2016, foi lançado mais um documento, fundamentado com base na evidência e numa revisão científica exaustiva.

Estas diretrizes têm como intenção, fornecer aos médicos veterinários de pequenos animais, as recomendações científicas mais atuais, bem como as melhores práticas de vacinação a nível mundial. Fica, assim, ao critério de cada um a discussão e adaptação destas recomendações às suas realidades (Day *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Exemplo de um calendário vacinal, para os cães residentes em Portugal, baseado nas últimas recomendações da WSAVA.

Vacina \ IDADE	Meses	2 meses	3 meses	4 meses	7 meses	Frequência
	Semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas	30 semanas	
Parvovírus canino Esgana canina Adenovírus canino tipo 2 Raiva						Triannual
						Triannual
						Triannual
						Triannual
Parainfluenza canina						Anual
Leptospira interrogans						Anual
Borrelia burgdorferi						Anual (Sazonal)
Bordetella bronchiseptica *						Anual (Sazonal)

* Via Intranasal. No caso de vacina inativa/morta (via parentérica) é necessário administrar um reforço após 4 semanas.

Legenda: As vacinas nucleares estão assinaladas a verde; já as não-nucleares estão assinaladas a amarelo. As vacinas não-nucleares, que devem ser adaptadas à necessidade específica de cada cão, estão assinaladas a cor de laranja.

Idealmente, o intervalo entre revacinações deveria ser determinado individualmente e, de forma a que a imunidade se mantivesse sempre acima de níveis considerados protetores, evitando revacinações desnecessárias (Tizard & Ni, 1998).

O calendário vacinal recomendado, adaptado das mais recentes diretrizes para a vacinação de animais de companhia publicadas pela WSAVA, está disponível no ANEXO I.

4.4.1. Primovacinação

Em conformidade com as últimas recomendações da WSAVA (2016), um cão pode iniciar a vacinação a partir das 6-8 semanas, seguindo-se um reforço a cada 2-4 semanas até o animal atingir as 16 semanas de idade. Só nessa altura se considera completa a primeira série de vacinações sendo que o animal poderá começar a frequentar espaços públicos 2-3 semanas após a última dose da vacina (Day *et al.*, 2016).

A necessidade da administração de várias doses vacinais, durante a primovacinação, assenta sobretudo no impacto negativo da eventual presença de AcM's, na altura das vacinações do cachorro (Wilson^a *et al.*, 2014).

Em cachorros seronegativos, ou seja sem AcM's, uma única dose vacinal poderá ser suficiente para induzir proteção, mesmo às 6 semanas de idade (Wilson^b *et al.*, 2014).

A recomendação recente, que indica que a última dose da primovacinação seja administrada às 16 semanas de idade, baseia-se em vários estudos que demonstraram que

os AcM's podem persistir, por períodos de tempo superiores àqueles que estavam estabelecidos (Horzinek, 2010).

O número de vacinações necessárias durante esta fase é variável, sendo determinado pela idade em que foi iniciado o protocolo vacinal (Day *et al.*, 2016). Por exemplo, se na altura da primeira vacina o animal tiver idade superior a 16 semanas, será apenas necessária a administração de uma única dose (Day *et al.*, 2016).

Ao contrário do que acontece nos humanos, a idade do cão na altura da primeira consulta pode variar muito, dependendo sobretudo de como, e quando, foi adquirido, e do nível de informação do tutor do animal.

Após terminar a primeira série de vacinas, o cão deve receber mais um reforço, que é administrado, ou quando o animal completa um ano de vida ou 12 meses após a última vacina (Day *et al.*, 2016).

Atualmente, sabe-se que o objetivo desta vacinação não é reforçar uma resposta imunitária preexistente, mas sim induzir uma resposta imunitária, em cães que possam ter falhado na resposta à primovacinação. Este período de 12 meses foi determinado pela habitual necessidade de revacinação anual e também por uma questão de conveniência, por ser uma boa altura para a realização do primeiro *check-up* anual (Day *et al.*, 2016).

Isto implica que, no caso de não responder de forma adequada à primovacinação, o animal ficará desprotegido até voltar a ser vacinado, aos 12 meses. Por este motivo, as diretrizes mais recentes da WSAVA sugerem que esta revacinação deve ser realizada mais cedo, isto é, entre as 26 e as 52 semanas de idade, sendo que, após esta vacinação, o animal só deverá ser revacinado daí a 3 anos (Day *et al.*, 2016).

Esta nova recomendação, não exclui a possibilidade de uma consulta aos 12-16 meses de idade, para avaliar o estado hígido do animal e realizar outras vacinações não-nucleares, que possam ser necessárias (Day *et al.*, 2016).

4.4.2. Vacinação na idade adulta

Até há relativamente pouco tempo, as vacinas nucleares para animais de companhia tinham uma DI mínima de 1 ano, sendo recomendada a revacinação anual, embora a preocupação com a elevada frequência de administração de vacinas, seja um assunto controverso há mais de duas décadas (Smith, 1995).

No século passado, no início da fase de desenvolvimento das vacinas, pensava-se que a proteção máxima seria alcançada pela estimulação antigénica recorrente, sendo

recomendada a revacinação anual. Ao longo dos anos, esta prática tornou-se comum e foi amplamente aceite pelos médicos veterinários, tanto que se manteve, mesmo com o aparecimento das vacinas vivas atenuadas, mais eficazes (Horzinek, 2006).

Devido ao crescente interesse da comunidade científica, em relação à duração da imunidade e à necessidade de revacinação anual, foram realizados muitos estudos que concluíram de modo consistente, no que diz respeito às VVA's, que a imunidade persiste durante pelo menos 3 anos. Como consequência, muitas bulas foram atualizadas para uma DI mínima de 3 anos, sendo que a DI real é provavelmente superior para a maioria dos animais (Day *et al.*, 2016).

Hoje em dia, para as vacinas nucleares, recomenda-se que a revacinação de um cão adulto seja trienal (Ford, 2013; Day *et al.*, 2016). No caso do estatuto imunitário de um animal adulto ser desconhecido é apenas necessária a administração de uma única dose vacinal (Day *et al.*, 2016).

De facto, a maioria das VVA's já estão licenciadas para revacinação trienal em animais adultos. No entanto, em alguns países ainda é possível encontrar uma DI mínima de 1 ano. Isto acontece porque, ou o fabricante não solicitou a alteração das recomendações presentes do produto, ou a autoridade de registo nacional ainda não validou a realização dessa alteração (Day *et al.*, 2016). Nestes casos, o médico veterinário, para se salvaguardar, terá de obter o consentimento do tutor do animal para vacinar de acordo com as novas recomendações.

4.5. Falhas vacinais

Nenhuma vacina pode garantir uma eficácia de 100% (Greene & Levy, 2012). Em vez disso, as vacinas atuam no sentido de reduzir, não só a gravidade da sintomatologia associada à doença, como também o número de animais suscetíveis numa população, contribuindo para a redução da incidência da doença e da taxa de mortalidade.

As causas de falha vacinal podem estar relacionadas com fatores intrínsecos do hospedeiro, erro humano, ou fatores relacionados com o produto. Estas causas estão descritas na Tabela 5, sendo a neutralização do Ag vacinal pelos AcM's, apontada como a causa mais frequente de falha vacinal (Pollock & Carmichael, 1982; Chappuis, 1998; Greene & Levy, 2012; Day *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Fatores que podem influenciar a eficácia da vacinação (adaptado de Greene & Levy, 2012).

FATORES DEPENDENTES DO HOSPEDEIRO	FATORES DEPENDENTES DO PRODUTO	ERRO HUMANO
<ul style="list-style-type: none"> ○ Interferência com os AcM's; ○ Imunodeficiências; ○ Idade; ○ Gestação; ○ Stress ou doença concomitante; ○ Pirexia, hipotermia; ○ Doença no período de incubação; ○ Fármacos citotóxicos ou glucocorticoides; ○ Anestesia e/ou cirurgia. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Perda de eficácia durante a manipulação; ○ Armazenamento inadequado; ○ Variação biológica; ○ Estirpe errada; ○ Atenuação excessiva; ○ Exposição excessiva. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mistura inadequada de produtos; ○ Exposição ao agente no momento da vacinação; ○ O uso concomitante de antimicrobianos ou fármacos imunossupressores; ○ Uso simultâneo de soros hiperimunes; ○ Administração muito frequente (intervalo <2 semanas); ○ Desinfecção desapropriada da pele; ○ Via de administração errada.

Os fatores que assumem maior importância são:

1) Neutralização do Ag vacinal devido à presença de AcM's;

Como já foi referido, o nível de AcM's varia dependendo do título da mãe, por essa razão, filhos de cadelas previamente infetadas com CPV têm uma maior probabilidade de falhar a resposta à vacinação precoce. As ninhadas mais pequenas, à partida, irão atingir um título de AcM's superior àquele conseguido por ninhadas com mais elementos sendo que, dentro de cada ninhada, o cachorro que mamar mais colostro terá um nível de AcM's superior ao dos restantes (Mila *et al.*, 2014).

2) A vacina é pouco imunogénica;

Existem evidências de que vacinas de fabricantes distintos possuem diferentes níveis de eficácia (Tizard & Ni, 1998; Friedrich & Truyen, 2000; Coyne *et al.*, 2001; Almendra *et al.*, 2005). Para além disso, o armazenamento incorreto, nomeadamente no que diz respeito à temperatura e duração, pode dar origem a alterações na imunogenicidade do produto.

3) O animal não responde à vacinação (variação genética);

Se um animal não desenvolver uma resposta humoral após vacinações sucessivas, presume-se que, ou o seu sistema imunitário é geneticamente pouco responsivo ou não responde à vacinação por falhar no reconhecimento dos Ag's vacinais. A proporção destes casos é de 1:5000 no caso de vacinas

contra o CDV e 1:1000 em vacinas com valência para o CPV-2 (Day *et al.*, 2016).

Por vezes, questiona-se o porquê de um animal desenvolver uma doença após ter sido vacinado de forma correta e respeitando o protocolo vacinal recomendado. Já foram enumerados vários fatores que poderão estar na origem da falha vacinal, porém noutros casos, pode acontecer que na altura da vacinação o animal já esteja no período de incubação da doença. Outra possibilidade é que o animal contacte com o agente antes de conseguir produzir uma resposta adequada à vacinação (Greene & Levy, 2012).

Torna-se por isso essencial, que o tutor do animal seja informado, de forma clara e assertiva aquando da primeira consulta, que uma dose da vacina não confere proteção podendo pelo contrário, tornar o animal mais suscetível à doença. Por essa razão, o cachorro deverá permanecer num ambiente seguro, pelo menos até terminar a primeira série de vacinas, idealmente 2 a 3 semanas após terminar o protocolo da primovacinação.

Quando são levados pela primeira vez a um centro de atendimento médico veterinário, os animais podem contactar com elevadas concentrações de agentes patogénicos (Greene & Levy, 2012). A exposição pode ocorrer no exterior do CAMV, na sala de espera, áreas de passagem ou mesmo na sala de consulta sendo, a limpeza e desinfeção desadequadas e a impossibilidade de isolar animais infetados, as causas mais frequentes para a sua ocorrência.

O médico veterinário deve incentivar o tutor a transportar o animal ao colo e transmitir que, em ambiente hospitalar, o controlo de agentes infecciosos é muito difícil, mesmo tomando precauções. Deve ser desaconselhado o contacto com outros animais dentro do CAMV e a permanência na sala de espera por longos períodos de tempo, sendo preferível aguardar na viatura do tutor.

As vacinas devem permanecer em condições de armazenamento próprias, sendo preparadas imediatamente antes da administração. O seu manuseamento deve ser cuidadoso, e o médico veterinário deve certificar-se sempre que a vacina foi administrada corretamente.

Para mitigar as falhas vacinais devido à presença de AcM's, a primovacinação só deve terminar após as 16 semanas, e o reforço subsequente deve ser administrado entre as 26 e as 52 semanas de idade, tal como recomendam os especialistas da WSAVA (Day *et al.*, 2016).

4.6. Avaliação pós-vacinal da resposta humoral

Como já foi mencionado, a vacinação tem um papel fundamental na estimulação da imunidade humoral e celular, todavia, do ponto de vista prático e económico, apenas a imunidade humoral pode ser facilmente avaliada e relacionada com a proteção do animal (Greene & Levy, 2012). Neste contexto, o método mais utilizado internacionalmente para determinar não só o estatuto imunitário de animais vacinados, como também a eficácia do protocolo utilizado, é a titulação de anticorpos (Almendra *et al.*, 2005).

A avaliação do título de Ac's pode ser correlacionada com a proteção ou suscetibilidade para o CDV, CPV, CAV, *Borrelia burgdorferi* e *Leptospiras* (Coyne *et al.*, 2001). No entanto, para outros agentes infecciosos isto não é válido, como é o caso do vírus da parainfluenza, coronavírus e da *Bordetella bronchiseptica* (Coyne *et al.*, 2001). Neste momento, estão apenas disponíveis no mercado internacional testes rápidos capazes de avaliar a proteção para o CDV, CPV e CAV.

Apesar da avaliação do título de Ac's presente em circulação ser um bom indicador de proteção antiviral, este parâmetro não pode ser tido como absoluto (Greene & Levy, 2012), isto é, um animal com títulos de Ac's baixos não está forçosamente vulnerável à infeção (Litster *et al.*^b, 2012).

De facto, alguns animais podem estar protegidos na ausência de títulos de Ac's detetáveis (Tizard & Ni, 1998), principalmente quando se tratam de animais adultos, previamente vacinados (Greene & Levy, 2012), pois a imunidade celular e de memória podem ser suficientes para lhes conferir proteção (Coyne *et al.*, 2001).

A medição do título de anticorpos no soro pode, na prática clínica, dar ao médico veterinário informações valiosas em relação ao grau de proteção do animal contra algumas infeções virais (Greene & Levy, 2012) e à necessidade de proceder à revacinação.

A avaliação da resposta humoral após uma vacinação é muito importante uma vez que os cães que respondem à vacinação nuclear, com vacinas atenuadas, mantêm uma imunidade consistente por vários anos (memória imunológica) na ausência de revacinação (Bohm *et al.*, 2004; Mouzin *et al.*, 2004; Schultz, 2006; Mitchell *et al.*, 2012). Por esse motivo, a existência de uma resposta humoral pós-vacinal é a consideração mais importante para validar a eficácia de uma vacina (Litster *et al.*^a, 2012).

O título de Ac's desenvolvido após a vacinação pode ser avaliado a partir do 14.^o dia após a administração da vacina (Decaro *et al.*, 2014).

4.6.1. Testes para avaliação da imunidade humoral

Nos últimos anos têm-se registado grandes avanços no que diz respeito à eficácia e disponibilidade de testes rápidos baseados na técnica de ELISA, com capacidade de detetar a presença de títulos de anticorpos, considerados protetores (Day *et al.*, 2016).

Estes testes, específicos para CDV, CAV e CPV-2, são uma alternativa às outras técnicas laboratoriais utilizadas para este fim, nomeadamente à inibição da hemaglutinação e à seroneutralização, que continuam a ser os testes laboratoriais considerados “*gold-standard*” para o CPV e para o CDV, respetivamente.

Os testes rápidos, baseados na técnica de ELISA, têm-se tornado cada vez mais populares na classe médico-veterinária, pois permitem avaliar de forma rápida, durante a consulta e de modo simples e económico, a existência de imunidade humoral protetora. Estes testes podem ser realizados antes, ou após a vacinação, permitindo ao clínico avaliar a necessidade da sua administração (Day *et al.*, 2016).

Um resultado positivo conclui que não é necessário proceder à revacinação, uma vez que num animal vacinado este resultado tem uma boa correlação com a presença de imunidade protetora (Ford, 2013). Pelo contrário, um resultado negativo, indica que o cão possui uma quantidade de anticorpos inferior à desejada, sendo recomendado proceder à sua revacinação (Day *et al.*, 2016).

Como já foi referido, alguns cães seronegativos estão de facto imunes (falso-negativos), desenvolvendo uma resposta rápida e substancial à vacina, baseada na memória imunológica (Mouzin *et al.*, 2004 in Day *et al.*, 2016). Porém, como não é possível diferenciá-los de animais realmente desprotegidos, estes são considerados como não protegidos e potencialmente suscetíveis à infeção, pelo que devem ser revacinados (Day *et al.*, 2016).

Num animal previamente vacinado, um resultado negativo deve ser interpretado de acordo com a sua história vacinal. Por exemplo, é expectável que os níveis de imunoglobulinas decaiam ao longo do tempo para níveis considerados negativos. Desta forma, animais adultos previamente vacinados, que não tenham sido expostos ao Ag recentemente podem ter resultados negativos, mantendo porém a capacidade de resistir à infeção através dos linfócitos B de memória (Ford, 2013).

Por outro lado, um cachorro negativo após a primovacinação deve ser considerado suscetível à infeção, sendo que esta falha na imunização pode dever-se à presença de AcM's ou ao facto do animal ser geneticamente não responsivo à vacinação (Ford, 2013).

Estes *kits* podem ter várias utilidades:

- 1) Avaliação da resposta imunitária após a primovacinação;

- 2) Gestão de surtos;
- 3) Avaliação do título de Ac's em vez de revacinar automaticamente;
- 4) Gestão da entrada de novos animais em abrigos.

Na altura da interpretação dos resultados, alguns factos devem ser tomados em consideração, nomeadamente que:

- Os resultados são qualitativos e apenas diferenciam os animais protegidos dos suscetíveis;
- A única forma de se comprovar a existência de imunidade protetora é através da contraprova virulenta (Ford, 2013).

IV. ESTUDO EXPERIMENTAL

Durante o estágio curricular, foram acompanhadas as consultas de primovacinação, de 36 cães, nas quais foram realizadas colheitas de sangue para determinar a existência de imunidade humoral face ao CDV e ao CPV.

Foram recolhidas 84 amostras, onde se incluíram 7 amostras de cães adultos, não vacinados há pelo menos 3 anos (ANEXO II). Dessas 84 amostras apenas 46 foram utilizadas no presente estudo, representando 20 cães.

1. Critérios de inclusão

Todos os cachorros, incluídos neste estudo, foram desparasitados e avaliados por um médico veterinário do HEV, antes de cada vacinação. Foi sempre realizado um exame físico completo a cada animal sendo que, todos os cachorros foram considerados saudáveis e aptos para iniciar o protocolo vacinal.

Desconhece-se o estatuto imunitário das progenitoras, bem como a quantidade de colostro ingerida por cada cachorro.

Os critérios referidos permitiram selecionar um grupo de 20 cães (46 amostras), de raças, sexo e idades variáveis, que se apresentaram à consulta no HEV, entre Maio e Outubro de 2016.

Os cães foram distribuídos em 3 grupos: A (n=5); B (n=8); C (n=7).

No grupo A foram incluídos os cães que iniciaram a primovacinação com 6 semanas de idade. No grupo B, os animais cuja administração da primeira vacina ocorreu entre as 8 e as 12 semanas. No Grupo C, incluíram-se os animais adultos, não vacinados há pelo menos 3 anos.

Apenas foram incluídos, nos grupos A e B, os animais que realizaram, durante a primovacinação, três colheitas de sangue separadas 3 a 4 semanas, para que fosse possível avaliar, na primeira colheita, o estatuto imunitário conferido pela transferência de imunidade passiva materna, e, nas colheitas subsequentes, a resposta do SI às sucessivas vacinações.

2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo: (1) todos os cachorros considerados inaptos para iniciar o protocolo vacinal; (2) todos os animais que tinham iniciado a primovacinação após as 12 semanas de vida, ou cuja idade era desconhecida; (3) os cães que faltaram às consultas de vacinação agendadas, não sendo possível o seu acompanhamento durante a fase de primovacinação.

3. Material e Métodos

Foram colhidas amostras de sangue em EDTA (0,5 ou 1 ml) a partir da veia safena lateral, antes da administração da primeira vacina e, nas consultas dos 2 reforços vacinais subsequentes.

Cada amostra foi de seguida centrifugada (6000 rpm durante 10 minutos), sendo o plasma recolhido e conservado no congelador a -20 °C, até ao momento da realização do teste.

Os cães do grupo A foram vacinados com a vacina viva modificada, Nobivac® Puppy DP, contendo $5,0 \log^{10}$ TCID₅₀ de CDV (estirpe Onderstepoort) e $\geq 7,0 \log^{10}$ TCID₅₀ de CPV (estirpe 154).

Aos animais do grupo B foi administrada a vacina viva modificada, Nobivac® DHPPI, e que contém estirpes atenuadas do CDV (estirpe Onderstepoort) $\geq 10^4$ TCID₅₀, do CPV $\geq 10^7$ TCID₅₀ (estirpe 154), do adenovírus canino tipo 2 e do vírus da parainfluenza canina.

Desconhece-se quais as vacinas que poderão ter sido administradas, no passado, aos cães adultos incluídos no grupo C.

A todos os animais vacinados, foi administrado 1 ml de vacina reconstituída por via subcutânea. A reconstituição foi realizada adicionando o conteúdo de uma ampola de solvente para reconstituição de vacinas liofilizadas, ou de uma ampola de vacina para a leptospirose canina, Nobivac L4, tal como está indicado no folheto informativo disponibilizado pelo fabricante.

A avaliação da presença de títulos de anticorpos, considerados protetores, foi realizada através de testes rápidos baseados na técnica de ELISA, sendo que os resultados colorimétricos foram lidos por um espectrofotómetro.

4. Amostragem

4.1. Grupo A

Os cinco cães do grupo A são todos irmãos, provenientes de uma ninhada da raça Bobtail. Foram seguidos até perto das 11 semanas de vida, uma vez que nessa altura foram vendidos, perdendo-se o contacto com os novos tutores.

A primeira dose vacinal foi administrada às 6 semanas e 2 dias de vida, e a segunda, passadas 3 semanas.

Foram efetuadas três colheitas aos animais deste grupo. Nos dias anteriores à administração das duas primeiras vacinas e, 10 dias após a segunda dose, isto é às 10 semanas e 5 dias de idade, tal como está descrito na Tabela 6.

Com este grupo, pretende-se avaliar a variabilidade da resposta à vacinação iniciada às 6 semanas de idade, entre cachorros da mesma ninhada.

Tabela 6 - Idades dos animais do grupo A aquando da colheita das várias amostras.

Grupo A

ANIMAL (Nº)	Idade (semanas) Amostra 1	Idade (semanas) Amostra 2	Idade (semanas) Amostra 3
1	6,3	9,3	10,7
2	6,3	9,3	10,7
3	6,3	9,3	10,7
4	6,3	9,3	10,7
5	6,3	9,3	10,7

4.2. Grupo B

No grupo B estão reunidos os cães com idades entre as 8 e as 12 semanas de idade, de diferentes origens, sexo e raças.

Os animais 4 e 7, já tinham recebido uma dose vacinal de Nobivac® Puppy DP e Vanguard® CPV respetivamente. No entanto, como estas vacinações não foram realizadas no HEV, a sua administração não foi considerada na altura de agrupar os animais, pelo que, apenas ficámos com essa observação para a discussão dos resultados. Os animais 5 e 6 eram irmãos da mesma ninhada.

Foram efetuadas três colheitas a cada animal, durante as consultas de vacinação. Na Tabela 7, são descritas as idades dos cães na altura da colheita das amostras.

Em relação à vacinação, foi utilizada a vacina viva liofilizada polivalente, Nobivac® DHPPi, que contém estirpes avirulentas do CDV (estirpe Onderstepoort), do CPV (estirpe 154), do adenovírus canino tipo 2 e do vírus da parainfluenza canina.

A reconstituição foi realizada no momento da vacinação, adicionando-se ou o conteúdo de uma ampola de solvente para vacinas liofilizadas, ou o da vacina para a leptospirose canina, Nobivac® L4.

O grupo B reflete uma amostra de cães que seguem o protocolo vacinal recomendado.

Tabela 7 - Idades dos animais do grupo B aquando da colheita das várias amostras.

Grupo B

ANIMAL (Nº)	Idade (semanas) Amostra 1	Idade (semanas) Amostra 2	Idade (semanas) Amostra 3
1	8,9	11,9	15,6
2	8,7	13,1	20,7
3	11,7	15,9	19,9
4	8,9	13,3	16,7
5	11,1	15,4	21,4
6	11,1	15,4	21,4
7	9,6	13,9	18,9
8	8	12	16

4.3. Grupo C

No grupo C, estão inseridos os animais adultos e o principal objetivo foi perceber qual o estatuto imunitário destes cães não vacinados há pelo menos 3 anos. Na Tabela 8 descrevemos as idades dos animais, assim como o tempo decorrido desde a sua última vacinação.

Tabela 8 - Idades dos animais do grupo C e o tempo decorrido desde a última vacinação.

Grupo C

ANIMAL (Nº)	Idade (anos) Amostra 1	Tempo decorrido desde a última vacinação
1	3,7	3 anos
2	7	5 anos
3	6	6 anos
4	18	8 anos
5	9	9 anos
6	16	12 anos
7	8	Nunca foi vacinado

5. Testes utilizados

Recorremos ao teste rápido TiterCHEK® CDV/CPV test da Synbiotics Corporation, gentilmente cedido pela Zoetis® (Figura 2).

Os testes foram realizados segundo as instruções do fabricante que estão disponíveis para consulta no ANEXO IV.

Estes testes colorimétricos, baseados na técnica de ELISA indireta (Figura 3), são utilizados para estimar os níveis de anticorpos para o CDV e CPV, em amostras de soro ou plasma, com o objetivo de saber qual o estatuto imunitário do cão.

O resultado é uma avaliação qualitativa uma vez que a informação revelada é se o cão tem, ou não, títulos de anticorpos considerados protetores, não sendo possível quantificar a titulação.

Figura 2 - TiterCHEK® CDV/CPV test.

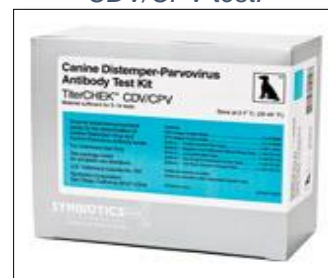
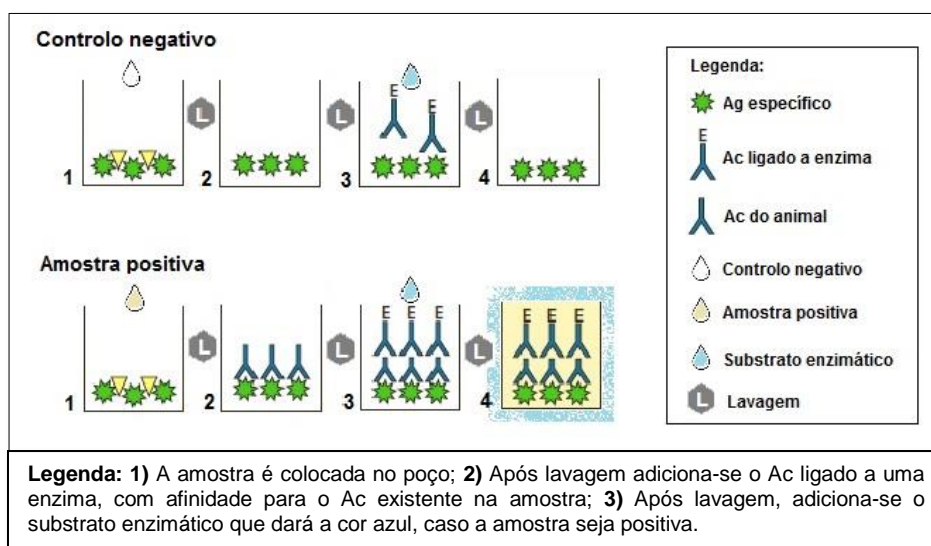


Figura 3 - Técnica de ELISA indireta (adaptado de Day, 2014).



Legenda: 1) A amostra é colocada no poço; 2) Após lavagem adiciona-se o Ac ligado a uma enzima, com afinidade para o Ac existente na amostra; 3) Após lavagem, adiciona-se o substrato enzimático que dará a cor azul, caso a amostra seja positiva.

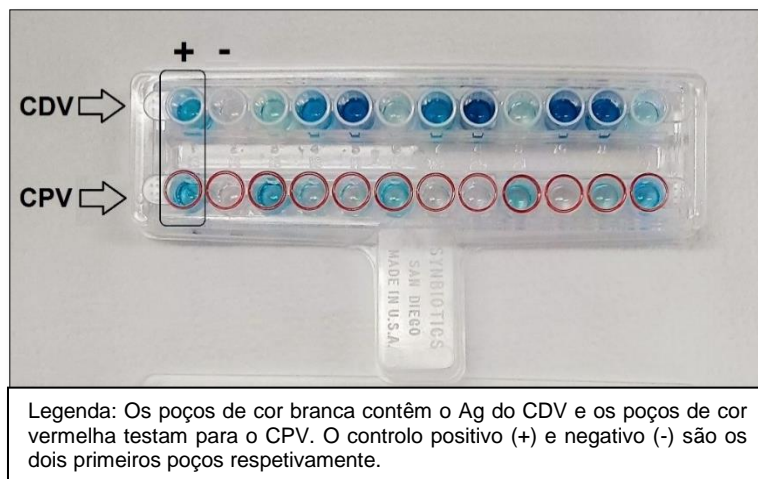
Para determinar a positividade da amostra, esta deve ser comparada com um controlo positivo que é disponibilizado com o teste, tal como o controlo negativo. Sempre que a intensidade da cor da amostra for igual ou superior à cor do controlo positivo, essa amostra é considerada positiva, indicando que o animal está protegido. Pelo contrário, uma amostra negativa não indica necessariamente que o animal esteja suscetível à infeção (Ford, 2013), principalmente em animais previamente vacinados.

Em relação ao CDV, um resultado positivo indica um título de SN igual ou superior a 1:16, e um resultado negativo um título de SN inferior a 1:16.

No caso do CPV, um resultado positivo do teste indica um título de IH de 1:80 ou superior, e um resultado negativo um título de IH menor que 1:80.

Estes valores foram extrapolados a partir das técnicas laboratoriais padronizadas para a medição de títulos de Ac's, que são a seroneutralização, no caso do CDV, e o teste de inibição da hemaglutinação, para o CPV.

Figura 4 - Exemplo dos resultados obtidos após realização do teste rápido.



Estes *kits* são altamente específicos (Especificidade de 95% para o CDV e 98% para o CPV), sensíveis (Sensibilidade de 88% para o CDV e 98% para o CPV) e simples de executar. Os resultados são obtidos em 15-20 minutos, o que permite a sua realização e leitura durante a consulta.

As instruções dadas pelo fabricante indicam que uma avaliação colorimétrica comparativa, a olho nu, é suficiente para aferir a positividade de uma amostra, no entanto, complementamos esta observação com uma medição quantitativa da absorvância no espectrofotômetro FLUOstar optima da BMG Labtech, para tornar a avaliação ainda mais objetiva. Utilizou-se uma amostra-padrão em conjunto com outras amostras, que foram lidas a diferentes comprimentos de onda, sendo que foi selecionado para a leitura o comprimento de onda de 405nm. Os valores de absorvância foram depois convertidos em densidades óticas.

V. RESULTADOS

Os resultados que se seguem foram obtidos através da leitura da densidade ótica (DO) de cada amostra. A densidade ótica foi proporcionalmente correlacionada com o título de Ac's anti-CDV e anti-CPV presentes na amostra, tendo sempre em conta a DO do controlo positivo de cada grupo.

Os resultados são apresentados por grupo e, dentro de cada grupo, por doença.

1. Primovacinação com início às 6 semanas de idade (Grupo A)

Inicialmente todos os cães deste grupo estavam desprotegidos para o CDV. Em relação ao CPV, apenas o animal 4 possuía um título de AcM's protetor antes da vacinação, todos os outros animais estavam desprotegidos (Tabela 9).

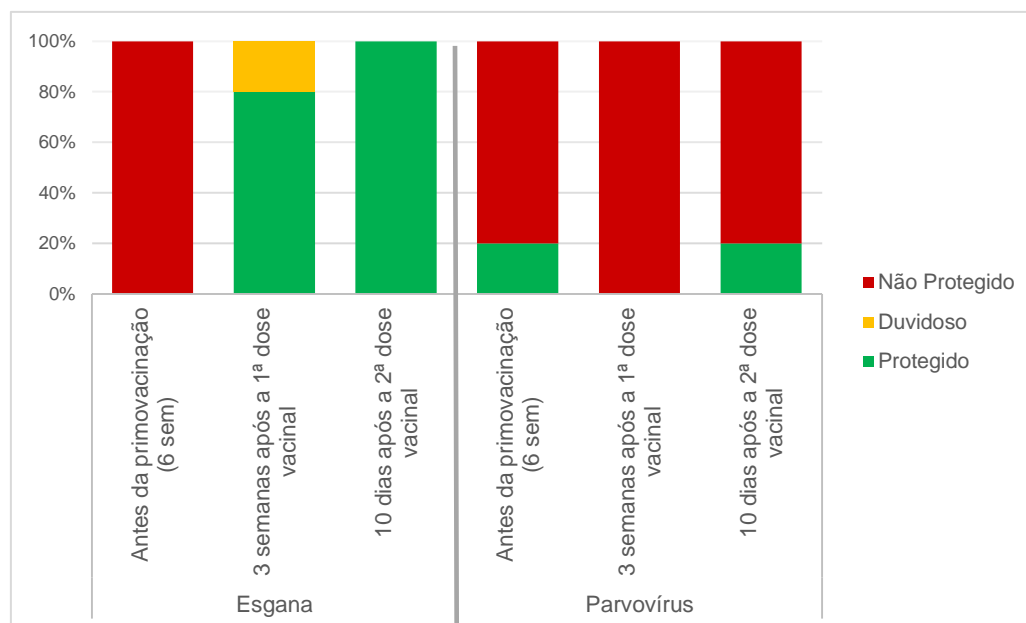
Três semanas após a primeira vacinação, apenas o animal 3 se mantinha desprotegido para o CDV, todos os outros responderam eficazmente à vacinação. Enquanto, para o CPV, todos os cães testaram negativo (Tabela 9).

Após a segunda dose vacinal, todos os animais ficaram protegidos para o vírus da esgana. No caso do CPV, o cão 5 foi o único que conseguiu montar uma resposta imunológica, todos os outros cotinuarão desprotegidos, necessitando de mais reforços vacinais para desenvolverem imunidade humoral contra este agente (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A.

Animal (Nº)	Amostra 1 (6,3 sem)		Amostra 2 (9,3 sem)		Amostra 3 (10,7 sem)	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-
3	-	-	-	-	+	-
4	-	+	+	-	+	-
5	-	-	+	-	+	+

Gráfico 1 - Taxas de proteção do grupo A para a esgana e para o parvovírus.



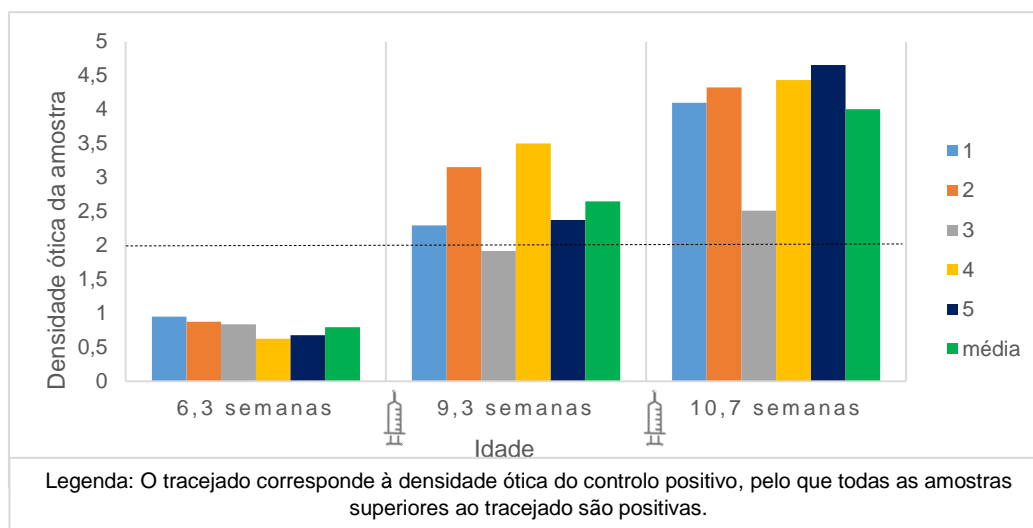
1.1. Resultados do grupo A para o vírus da esgana

Às 6,3 semanas de idade, antes de serem vacinados, nenhum dos cães do grupo A apresentava um título de Ac's protetor para o CDV.

Três semanas após a primeira vacina, já 80% dos animais possuíam títulos de Ac's superiores ao título a partir do qual o animal é considerado protegido. O único animal (20%) que não estava protegido para CDV foi o animal 3, cujo resultado foi considerado duvidoso devido à proximidade de absorvância com o controle positivo (ANEXO III - Tabela 15).

Dez dias após a segunda dose vacinal, 100% dos cães estavam imunizados para CDV (Gráfico 1).

Gráfico 2 - Resultados para CDV após medição das densidades óticas das amostras do grupo A no espectrofotômetro.

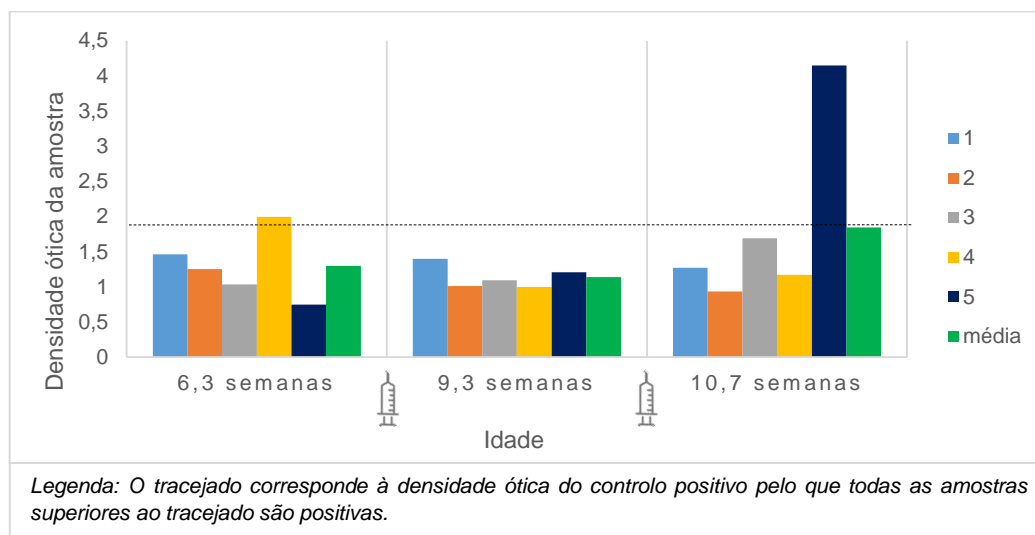


1.2. Resultados do grupo A para o parvovírus

Antes de iniciar a primovacinação só um cão (animal 4) tinha um título de AcM's protetor.

Três semanas após a 1.^a dose vacinal, todos os cães estavam desprotegidos para CPV. Passados dez dias da 2.^a vacina, isto é, às 10 semanas de idade, apenas o animal 5 (20%) se encontrava protegido para o CPV (Gráfico 2).

Gráfico 3 - Resultados para CPV após medição das densidades óticas das amostras do grupo A no espectrofotómetro.



2. Primovacinação com início entre as 8 e as 12 semanas de idade (Grupo B)

No grupo B estão agrupados cachorros um pouco mais velhos, que iniciaram a vacinação após as 8 semanas. Tal como foi referido na descrição da amostragem, os animais 4 e 7 já tinham recebido uma vacina antes da primeira colheita, Nobivac® Puppy DP e Vanguard® CPV, respetivamente.

Na altura da primeira colheita de sangue, dois cães revelaram títulos de Ac's anti-CDV protetores. Face ao CPV apenas um cão estava protegido (Tabela 10).

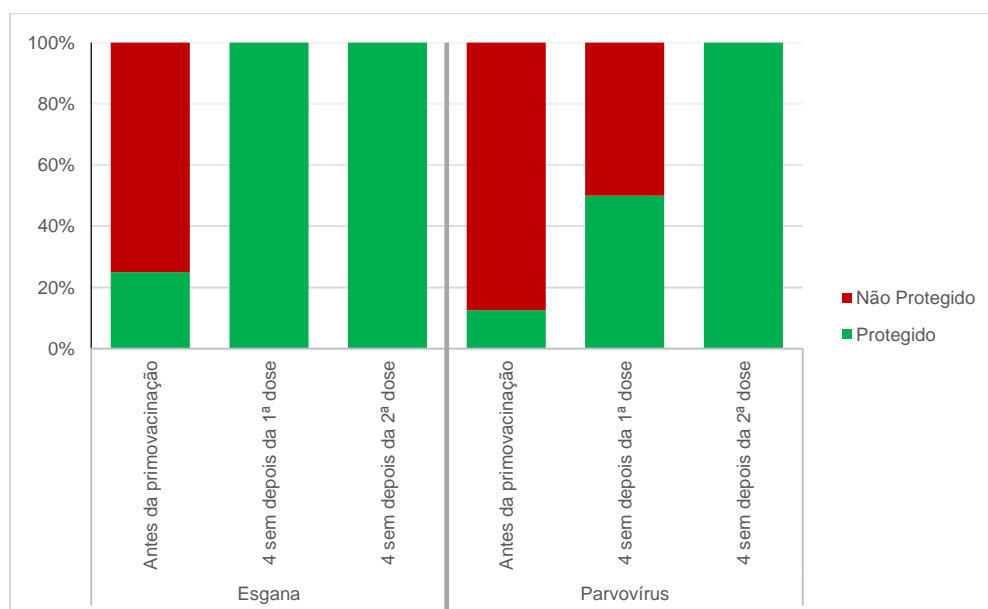
Quatro semanas após a primeira vacinação realizada no HEV, 100% dos cães deste grupo ficou protegido para CDV. Na mesma altura, em relação ao CPV, apenas 50% dos cães adquiriu proteção (Tabela 10).

Por fim, após a segunda dose vacinal todos os animais adquiriram proteção para os dois vírus (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B.

Animal (Nº)	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	+	-	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+
6	-	-	+	-	+	+
7	-	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+

Gráfico 4 - Taxas de proteção do grupo B para esgana e parvovírus.



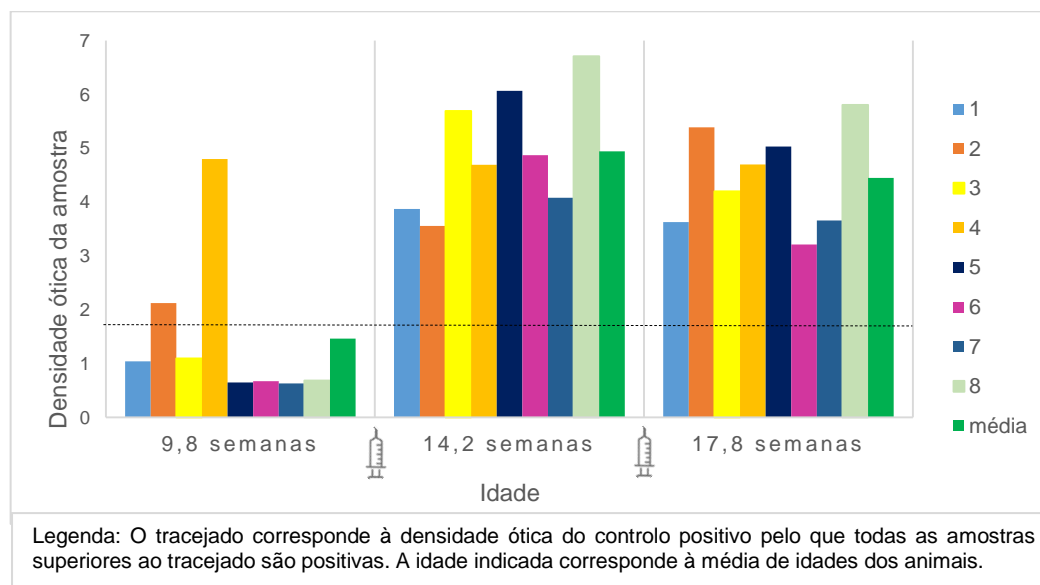
2.1. Resultados do grupo B para o vírus da esgana

Inicialmente, dois cães deste grupo (animal 2 e animal 4) possuíam títulos protetores para o CDV, sendo que, como já foi mencionado, o animal 4 tinha recebido uma dose vacinal de Nobivac® Puppy DP antes da primeira colheita (Gráfico 5).

Todos os cachorros deste grupo desenvolveram uma resposta imunitária para o CDV após a administração da 1.ª vacina, atingindo níveis de Ac's anti-CDV acima do limiar de proteção (Gráfico 4 e 5).

Como esperado, após a segunda dose vacinal todos os animais continuavam protegidos para CDV (Gráfico 4 e 5).

Gráfico 5 - Resultados para CDV após medição das densidades óticas das amostras do grupo B no espectrofotómetro.



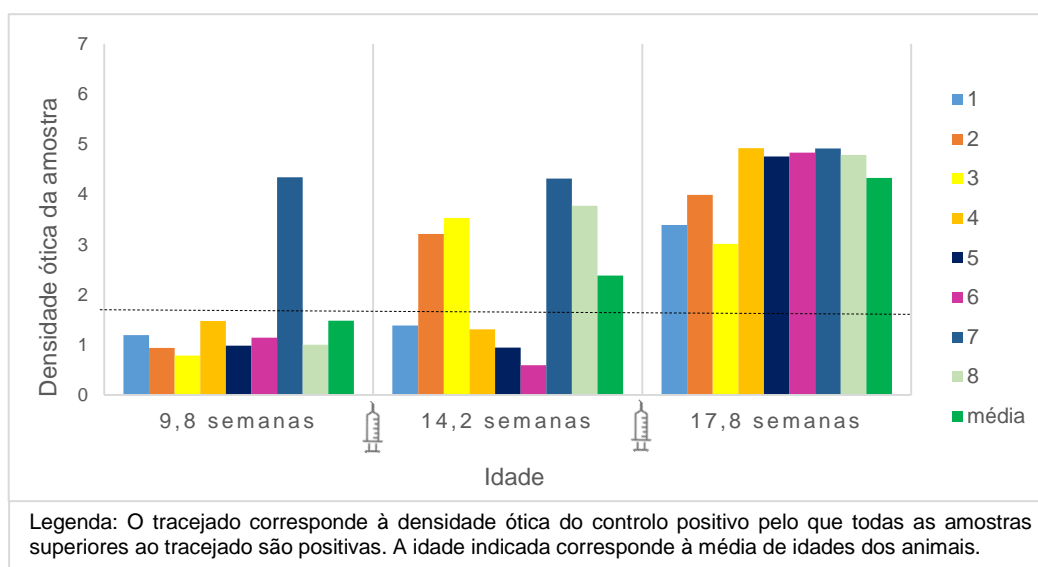
2.2. Resultados do grupo B para o parvovírus

Inicialmente, apenas o animal 7 estava protegido para CPV, sendo que se manteve imune ao longo das várias colheitas realizadas (Gráfico 6).

A primeira vacinação foi suficiente para que os cães 2, 3 e 8 adquirissem imunidade protetora contra este vírus (Gráfico 6).

Após a 2.^a dose vacinal, todos os cães desenvolveram títulos de Ac's anti-CPV protetores (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Resultados para CPV após medição das densidades óticas das amostras do grupo B no espectrofotómetro.



3. Rastreio imunitário de animais não vacinados há pelo menos 3 anos (Grupo C)

No grupo C, constituído por cães adultos, somente o animal 1, vacinado há 3 anos, se encontrava protegido para as duas doenças infecciosas (Tabela 11).

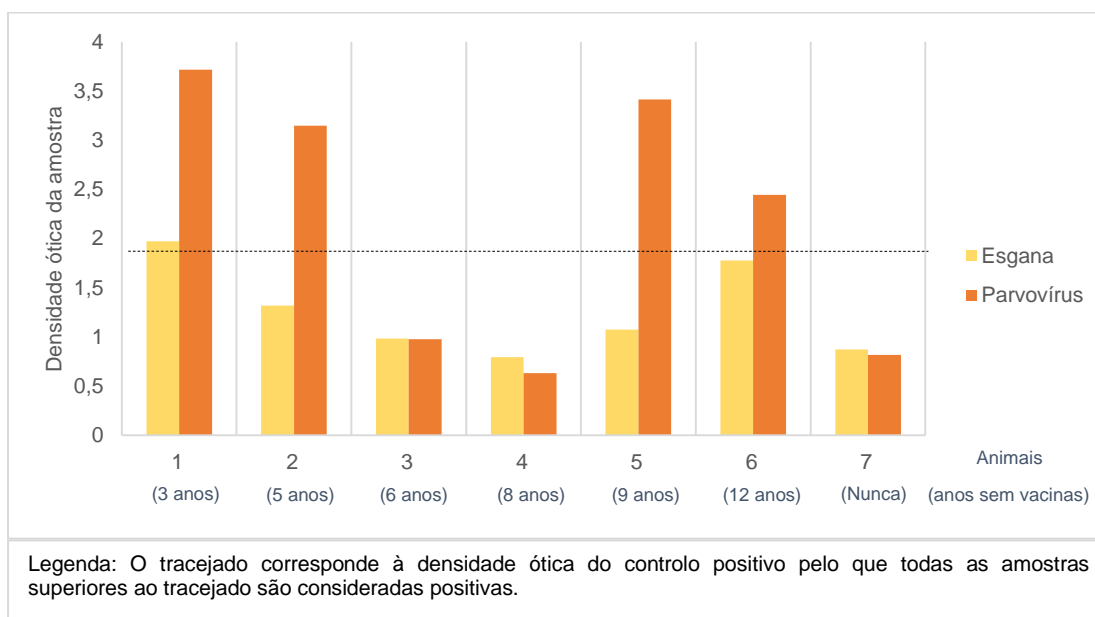
Os animais 2, 5 e 6, vacinados há 5, 9 e 12 anos, respetivamente, mantinham imunidade humoral para o CPV, suficiente para impedir uma infeção, mas estavam desprotegidos para o CDV (Tabela 11). No caso específico do animal 6, o seu resultado para o CDV foi considerado um “negativo duvidoso”, por estar muito próximo do controlo positivo (Gráfico 7).

Os restantes, isto é, os animais 3 e 4, vacinados há 6 e 8 anos respetivamente, estavam desprotegidos quer para o CDV, quer para o CPV. Assim como o animal 7, que, como espectável, também estava desprotegido para os dois vírus (Gráfico 7).

Tabela 11 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C.

Animal (Nº)	Amostra 1	
	CDV	CPV
1	+	+
2	-	+
3	-	-
4	-	-
5	-	+
6	-	+
7	-	-

Gráfico 7 - Resultados para o CPV e CDV após medição no espectrofotómetro das densidades óticas das amostras do grupo C.



VI. DISCUSSÃO

1. Grupo A - Primovacinação com início às 6 semanas de idade

De acordo com a literatura, o momento exato em que os AcM's são depurados na sua totalidade, depende do título de anticorpos que o neonato recebeu inicialmente (Greene & Levy, 2012). O facto do animal 4 ser o único que possuía um título protetor para CPV antes da vacinação, sugere que este cachorro teve a transferência de AcM's mais eficiente da ninhada, isto é, foi aquele que ingeriu mais colostro.

A variabilidade em relação ao nível de AcM's é explicada pela quantidade de colostro ingerido pelos cachorros e pelo título de Ac's da progenitora (Mila et al., 2014). Neste caso, o título da progenitora é igual para todos os animais sendo, por isso, a quantidade de colostro ingerido por cada cachorro a única variável a considerar. É provável que o título de Ac's da progenitora fosse baixo para o CDV, não garantindo uma boa transferência de AcM's através do colostro. De outra forma, o animal 4 estaria protegido pelos AcM's não só para CPV como também para CDV.

O único cachorro que ficou protegido para CPV, após a 2.^a vacinação (animal 5), foi o mesmo que apresentou a menor concentração de Ac's antes da primeira vacina, ou seja, aquele que ingeriu menos colostro.

As duas doses vacinais que o animal 5 recebeu foram suficientes para lhe induzir imunidade contra CPV. Para este cachorro o protocolo vacinal, para CDV e CPV poderia ter terminado às 10 semanas de idade e, pouco tempo depois, o cachorro poderia ter começado a socializar com outros animais e a frequentar espaços públicos com segurança.

Relativamente ao CDV, após a primeira vacinação, o animal 3 foi considerado um “negativo duvidoso” por se encontrar muito próximo do controlo positivo. O título de Ac's presente em circulação é um indicador de proteção, mas não pode ser entendido como um valor absoluto (Greene & Levy, 2012). Para além disso, existe uma variação biológica individual que inviabiliza a existência de um título que distinga de forma absoluta os animais protegidos dos não protegidos. Desta forma, o animal 3 provavelmente já estava protegido para CDV após a primeira vacina. Certamente que na altura da primovacinação, os cachorros desta ninhada ou eram seronegativos ou possuíam um baixo título de AcM's para o vírus da esgana, caso contrário, não seria possível a aquisição de proteção através de uma única dose vacinal, devido ao mecanismo de inibição da produção endógena de IgG's, na presença de AcM's (Greene & Levy, 2012).

No que diz respeito ao CPV, apesar do animal 4 ser o único a apresentar um título protetor (> 1:80 IH) antes da primovacinação, o que poderia sugerir que não respondesse à vacina, nenhum dos outros cachorros respondeu à primeira dose vacinal. Segundo Pollock &

Carmichael (1982), animais que possuam AcM's anti-CPV em títulos de IH superiores a 1:20 não respondem eficazmente à vacinação. Podemos então supor que o título de IH dos cachorros que se encontravam inicialmente desprotegidos seria superior a 1:20.

Provavelmente os animais que não responderam à 2.^a vacinação, estariam a passar pelo período crítico de suscetibilidade, durante o qual o cachorro permanece refratário à imunização, mas cujo título não é suficiente para impedir o desenvolvimento da doença em caso de exposição (Pollock & Carmichael, 1982).

2. Grupo B - Primovacinação com início entre as 8 e as 12 semanas de idade

Neste grupo os animais provêm de diferentes origens, à exceção do animal 5 e do animal 6 que eram irmãos.

Todos os cães deste grupo desenvolveram uma resposta imunitária para o CDV após a administração da 1.^a vacina, atingindo níveis de Ac's anti-CDV muito acima do limiar de proteção. Isto sugere que não houve interferência com os AcM's, suficiente para neutralizar o Ag vacinal. É importante realçar que não houve alterações entre os resultados obtidos após a 1.^a e após a 2.^a vacinação, pelo que provavelmente, uma dose vacinal seria suficiente para imunizar estes cachorros contra o CDV.

Ao contrário dos restantes, os animais 4 e 7 tinham recebido uma vacina antes da 1.^a colheita, no entanto a sua resposta à vacinação foi diferente. Enquanto o animal 7 já estava protegido contra o CPV na altura da 1.^a vacina, o animal 4 só atingiu títulos protetores na última colheita. O que sugere que o título de AcM's anti-CPV do animal 4 seria superior, impedindo-o de responder à vacinação mais cedo. As vacinas administradas eram de diferentes fabricantes o que também pode ter tido alguma influência na indução da resposta imunitária. Para além do CPV, a vacina administrada ao animal 4 (Nobivac® Puppy DP) continha também o vírus da esgana atenuado, despoletando a imunização ativa para este agente após a sua administração.

Quatro semanas após a 2.^a dose vacinal, todos os cães estavam protegidos, tanto para esgana como para parvovirus, terminando com sucesso a primovacinação. No entanto, tal como no grupo A, também no grupo B se verificou uma maior eficácia vacinal face ao vírus da esgana, tendo a vacina induzido uma resposta imunitária protetora em 100% dos animais, após uma única dose.

A variabilidade encontrada na resposta ao Ag vacinal do CPV poderá estar relacionada com as diferentes origens dos animais, com as diferenças na ingestão de colostro e, com o título de Ac's da progenitora. Sendo que, alguns cachorros apresentaram uma concentração de

AcM's anti-CPV superior, o que não lhes permitiu montar uma resposta imunitária tão cedo quanto os outros (Tizard & Ni, 1998).

3. Grupo C - Rastreio imunitário de animais não vacinados há pelo menos 3 anos

Os resultados por nós obtidos sugerem que não existe uma tendência em relação à duração da imunidade humoral nestes animais. Isto pode dever-se ao reduzido número de cães da amostra ou ao desconhecimento de quais as vacinas utilizadas, entre outras variáveis que possam ter condicionado o desenvolvimento de uma resposta imunitária adequada à vacinação. Para além disto, como não foi comprovada a existência de uma resposta imunitária na altura da vacinação, não temos a certeza que todos os cães deste grupo tenham ficado imunizados.

Como já referimos, o vírus da esgana é um vírus frágil no meio ambiente. Já o parvovírus é ubiquitário, capaz de resistir no exterior durante longos períodos de tempo. Assim, é fácil assumir que existe uma maior probabilidade de ocorrer exposição natural ao CPV sendo que, caso ocorra, vai provocar a estimulação antigénica do SI, mesmo que o cão não demonstre sinais clínicos. Ao contrário do que acontece com o CPV, a presença de Ac's anti-CDV é dificilmente explicada pelo contacto fortuito com o vírus no ambiente (Olson *et al.*, 1997).

Os animais deste grupo não foram submetidos a nenhuma restrição a nível ambiental, por isso, o elevado título de Ac's anti-CPV dos animais 2, 5 e 6, poderá não estar relacionado com a vacinação, mas sim com estímulos naturais através do contacto com o CPV presente no ambiente, durante o período em que não foram vacinados.

No caso específico do animal 6, que foi considerado um “negativo duvidoso” para CDV, não seria surpreendente se este animal resistisse à infeção, caso fosse exposto ao vírus. Isto porque o título de Ac's que confere proteção é variável entre indivíduos e, para além disso, nos testes que determinaram os títulos considerados protetores, podem ter sido utilizadas doses infetantes superiores às aquelas que causam infeção natural (Litster *et al.*^a, 2012). Desta forma, o valor do título protetor poderá estar sobrevalorizado.

Mesmo quando os Ac's atingem níveis indetetáveis, tal não significa que o animal seja suscetível (Tizard & Ni, 1998). Não podemos esquecer que a imunidade celular e a memória imunológica desempenham um papel fundamental na proteção contra estas doenças. Apenas a contraprova virulenta poderia comprovar o estatuto imunitário real destes cães.

Num estudo, realizado em cães não vacinados há pelo menos 4 anos, em que foram comparados os títulos de Ac's anti-CDV com a resposta dos animais à contraprova virulenta,

concluiu-se que 56% desses cães estavam suscetíveis à infecção pelo CDV, com títulos iguais ou inferiores a 16, porém todos os animais resistiram à infecção experimental (Jensen *et al.*, 2015).

Não foi possível tirar conclusões relativamente à variação de resultados entre indivíduos, porque como o ambiente não foi controlado, poderá ter ocorrido exposição natural ao agente. Também não devemos supor que a vacinação anterior tenha despoletado uma resposta imunitária eficaz e duradoura, porque num rastreio serológico realizado a 780 cães vacinados para o CDV e o CPV, de idades, sexo e raças variáveis, concluiu-se que a taxa de proteção varia consideravelmente de acordo com o fabricante da vacina (Almendra *et al.*, 2005).

Concluindo, todos os cães do grupo C, à exceção do animal 1, têm indicação para a revacinação, sendo que os animais 2, 5 e 6 necessitam apenas da vacinação para a esgana. Já os animais 3, 4 e 7, necessitam de ser imunizados contra os dois vírus, CDV e CPV.

O único cão protegido para ambos os vírus (animal 1) deverá realizar novo teste ou ser revacinado, após 6 meses.

VII. CONCLUSÃO

A vacinação faz parte de um programa de saúde completo, tanto em animais como em seres humanos, sendo o seu objetivo a proteção individual contra a doença e a manutenção de um elevado número de indivíduos protegidos numa determinada população, para que a doença não se disperse, nem ocorram surtos epidémicos (Coyne *et al.*, 2001).

O primeiro ano de vida de um cão é um período crítico no que respeita às doenças infetocontagiosas, pelo que uma primovacinação adequada é essencial na prevenção de doenças potencialmente fatais nesta fase.

O calendário vacinal deve ser adaptado às necessidades de cada animal individualmente (Day *et al.*, 2016). Para além disso, não devem ser administradas desnecessariamente, pois podem causar reações adversas e contribuir para o aparecimento de doenças auto-imunes. Porém, nem sempre a vacinação resulta numa boa imunização. Deste modo, é importante verificar se, após a administração de uma vacina, um animal ficou bem protegido ou, pelo contrário, se continua suscetível à infeção, na medida em que essa informação influenciará o seu calendário vacinal. Isto assume uma importância ainda maior na altura da primovacinação, pois a causa principal de falha na imunização é a neutralização do antígeno vacinal pelos anticorpos de origem materna.

Com este estudo foi possível concluir que, durante a primovacinação, uma vacina polivalente promove diferentes respostas imunitárias face aos agentes imunogénicos nela contidos, sendo por vezes necessária uma única administração para conferir proteção, principalmente para o CDV. Desta forma, o futuro poderá passar pela utilização mais frequente de vacinas monovalentes em detrimento das polivalentes.

A primovacinação para a esgana parece ser mais eficaz, induzindo uma resposta imunitária logo após a 1.^a dose vacinal. No entanto, isto está diretamente relacionado com a presença de anticorpos de origem materna. Assim, os resultados obtidos sugerem que a resposta à vacinação é individual, dependendo sobretudo do título inicial de anticorpos maternos adquirido pelo neonato. Neste contexto, o parvovírus parece representar uma maior ameaça para os cachorros durante a primovacinação.

A variabilidade encontrada reforça a importância da determinação dos níveis de imunidade humoral individuais. Deste modo, os *kits* ELISA são uma ferramenta muito vantajosa, pois permitem aferir proteção a um custo relativamente reduzido e durante a consulta. Estes testes deverão ser utilizados sobretudo para validar a eficácia vacinal induzida pela primovacinação, mas também, para auxiliar o médico veterinário a definir protocolos vacinais individualmente.

A utilização dos testes rápidos contribuirá para reduzir o número de cães suscetíveis a certas doenças, bem como do número de vacinações administradas desnecessariamente. O ideal seria a implementação destes rastreios como rotina, como acontece na indústria avícola e suínica (Twark & Dodds, 2000).

Por fim, é muito importante que todos os clínicos sejam encorajados a seguir as novas diretrizes para a vacinação de cães e gatos, recordando que:

- Cada cão é único no que diz respeito à sua raça, estilo de vida, idade, localização geográfica, ambiente e risco de exposição (Coyne *et al.*, 2001).
- A vacinação é um procedimento médico que requer as mesmas capacidades de raciocínio e considerações que são exigidas para a seleção de qualquer outro tratamento médico ou procedimento cirúrgico (Schultz, 1998).
- A vacinação não deve ser considerada um procedimento inócuo para os animais, pois pode ter consequências indesejáveis tanto para estes como para os seus tutores (Schultz, 1998).
- Devem ser administradas apenas as vacinas realmente necessárias com a menor frequência possível (Schultz, 1998).
- Dentro de uma população deve-se vacinar tantos animais quanto for possível (Schultz, 1998).
- Ao contrário do que acontece em cães adultos, muitos cachorros morrem devido a doenças infecciosas que poderiam ser prevenidas através da vacinação, ou porque não foram vacinados ou foram vacinados de modo incompleto (Schultz *et al.*, 2009).
- Sempre que possível devem ser seguidas as recomendações publicadas nas diretrizes para a vacinação de cães (Day *et al.*, 2016).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abdelmagid, O., Larson, L., Payne, L., Tubbs, A., Wasmoen, T. & Schultz, R. (2004). Evaluation of the Efficacy and Duration of Immunity of a Canine Combination Vaccine against Virulent Parvovirus, Infectious Canine Hepatitis Virus, and Distemper Virus Experimental Challenges. *Veterinary therapeutics*. 5(3) : 173-86.
- Almendra, C., Pinto, O., Carmichael, L. & Tavares, L. (2005). Determinação dos níveis de imunidade humoral induzidos pela vacinação contra a Esgana e a Parvovirose caninas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 100: 75-84.
- Appel, M. J. & Summers, B. A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 44,187-191.
- Bird, L. & Tappin, S. (2013). Canine Parvovirus: Where are we in the 21st Century?. *Companion Animal*. 18(4): 142-146.
- Böhm, M., Thompson, H., Weir, A., Hasted, A. M., Maxwell, N. S. & Herrtage, M. E. (2004). Serum Antibody Titres to Canine Parvovirus, Adenovirus and Distemper Virus in Dogs in the UK Which Had Not Been Vaccinated for at Least Three Years. *Veterinary Record* 154(15): 457-63.
- Chappuis, G. (1998). "Neonatal Immunity and Immunisation in Early Age: Lessons from Veterinary Medicine." *Vaccine* 16 (14-15): 1468-72.
- Coyne, M. J., Burr, J. H. H., Yule, T. D., Harding, M. J., Tresnan, D. B. & McGavin, D. (2001). Duration of Immunity in Dogs after Vaccination or Naturally Acquired Infection. *The Veterinary Record*. 149 (pp. 509-515).
- Crawford, P. C. & Sellon, R. K. (2010). Canine Viral Diseases. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Veterinary Internal Medicine*. (7th ed.). vol.1. (pp. 958-962). Canada: Saunders Elsevier Co.
- Day, M. J. (2007). Immune System Development in the Dog and Cat. *Journal of Comparative Pathology*, 137, 10-15.
- Day, M. J. (2012)^a. Basic Immunology. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*. (2nd ed.). (pp. 11-59). Bristol: Manson Publishing.
- Day, M. J. (2012)^b. Vaccination. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*. (2nd ed.). (pp. 413-430). Bristol: Manson Publishing.

- Day, M. J. (2014). Canine Vaccination Guidelines. 39th World Small Animal Veterinary Association Annual Conference: Proceedings Book. (pp. 551-54).
- Day, M. J. & Schultz, R. D. (2014). The immune response to infectious agents. In M. J. Day (Ed.), *Veterinary Immunology Principles and practice* (2nd ed.). (pp.153-156). New York: CRC Press.
- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D. & Squires, R. A. (2016). WSAVA Guidelines For The Vaccination of Dogs and Cats – Compiled by the Vaccination Guidelines Group of the World Small Animal Veterinary Association. *Journal of Small Animal Practice* (57) 1-45.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E. & Buonavoglia, C. (2005). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* (33) 261-267.
- Ford, R. B. (2013). Vital Vaccination Series: Antibody Titers *versus* Vaccination. *Today's Veterinary Practice* 3(3): 35-38.
- Ford, R. B. (2010). Companion Animal Vaccines and Vaccination. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Veterinary Internal Medicine*. (7th ed.). vol.1. (pp. 853-862). Canada: Saunders Elsevier Co.
- Friedrich, K. & Truyen, U. (2000). Untersuchung der wirksamkeit von parvovirussimpfstoffen und der effektivitat zweier impfschemata. *Praktischer Tierarzt* 81, 988-994.
- Gill, M., Srinivas, J., Morozov, I., Smith, J., Anderson, C., Glover, S., Champ, D. & Chu, H. (2004). Three-Year Duration of Immunity for Canine Distemper, Adenovirus, and Parvovirus after Vaccination with a Multivalent Canine Vaccine. *Int J Appl Res Vet Med* 2: 227-34.
- Greene, C. E. & Decaro, N. (2012). Canine Viral Enteritis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 67-75). Philadelphia: Saunders Elsevier Co.
- Greene, C. E. & Levy, J. K. (2012). Immunoprophylaxis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 1163-1204). Philadelphia: Saunders Elsevier Co.
- Greene, C. E. & Vandevelde, M. (2012). Canine Distemper. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 25-42). Philadelphia: Saunders Elsevier Co.

- Horzinek, M. C. (2006). Vaccine Use and Disease Prevalence in Dogs and Cats. *Veterinary Microbiology* 117(1): 2-8.
- Horzinek, M. C. (2010). Vaccination Protocols for Companion Animals: The Veterinarian's Perspective. *Journal of Comparative Pathology* 142(S1) 129-32.
- Jensen, W., Totten, J., Lappin, M. & Schultz, R. (2015). Use of serologic tests to predict resistance to canine distemper virus-induced disease in vaccinated dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 27(5): 576-80.
- Litster^a, A., Nichols, J. & Volpe, A. (2012). Prevalence of Positive Antibody Test Results for Canine Parvovirus (CPV) and Canine Distemper Virus (CDV) and Response to Modified Live Vaccination against CPV and CDV in Dogs Entering Animal Shelters. *Veterinary Microbiology* 157(1-2): 86-90.
- Litster^b, A., Pressler, B., Volpe, A. & Dubovi, E. (2012). Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs." *Veterinary Journal* 193(2): 363-66.
- Machado, I. C. (2016). Frequência de Doenças Infeciosas em Carnívoros Domésticos Hospitalizados na Unidade de Isolamento do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa de Outubro de 2013 a Janeiro de 2016. Dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.
- Martin, V., Najbar, W., Gueguen, S., Grousseau, D., Eun, H-M., Lebreux, B. & Aubert, A. (2002). Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology*, 89(2-3), 115-127.
- Mila, H., Grellet, A., Desario, C., Feugier, A., Decaro, N., Buonavoglia, C. & Chastant-Maillard, S. (2014). Protection against canine parvovirus type 2 infection in puppies by colostrum-derived antibodies. *Journal of nutritional science*. 3(e54): 1-4.
- Mitchell, S. A., Zwijsenberg, R.J., Huang, J., Hodge, A. & Day, M.J. (2012). Duration of Serological Response to Canine Parvovirus-Type 2, Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus Type 1 and Canine Parainfluenza Virus in Client-Owned Dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal* 90(12): 468-73.
- Morein, B., Abusugra, I. & Blomqvist, G. (2002). Immunity in Neonates. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87(3-4): 207-13.
- Mouzin, D. E., Lorenzen, M. J., Haworth, J. D. & King, V. L. (2004). Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224, 55-60.

- Olson, P., Finnsdóttir, H., Klingeborn, B. & Hedhammar, A. (1997). Short Communications: Duration of antibodies elicited by canine distemper virus. *The Veterinary Record* (141) 654-655.
- Ottiger, H-P., Neimeier-Förster, M., Stärk, K., Duchow, K. & Bruckner, L. (2006). Serological responses of adult dogs to revaccination against distemper, parvovirus and rabies. *The Veterinary Record* 159(1): 7-12.
- Peterson, M. E. & Kutzler, M. (2011). *Small Animal Pediatrics: The First 12 Months of Life*. Saunders Elsevier Co.
- Pollock, R.V. & Carmichael, L.E. (1982). Maternally Derived Immunity to Canine Parvovirus Infection: Transfer, Decline, and Interference with Vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180(1): 37-42.
- Schultz, R. D. (1998). Current and future canine and feline vaccination programs. *Veterinary Medicine*. 93, pp. 233-254.
- Schultz, R. D. (2006). Duration of Immunity for Canine and Feline Vaccines: A Review. *Veterinary Microbiology* 117(1): 75-79.
- Schultz, R. D., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P. & Larson, L. J. (2010). Age and Long-Term Protective Immunity in Dogs and Cats. *Journal of Comparative Pathology*. (142) pp102-108.
- Smith, C. A. (1995). Are we vaccinating too much? *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207(4) 421-425.
- Strasser, A., May, B., Teltscher, A., Wistrela, E. & Niedermüller, H. (2003). Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 94: 113-21.
- Sykes, J. E. (2014). *Canine and Feline Infectious Diseases*. Missouri: Saunders Elsevier Co.
- Thiry, E., & Horzinek, M. C. (2007). Vaccination Guidelines: A Bridge between Official Requirements and the Daily Use of Vaccines. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics) 26(2): 511-17.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology* (9th ed.). Missouri: Saunders Elsevier Co.

- Tizard I. & Ni, Y. (1998). Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213(1) 54-60.
- Twark, L., & Dodds, W. J. (2000). Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 217(7), 1021-1024.
- Willard, M.D. (2014). Digestive System Disorders. In R.W. Nelson & C.G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine*. (5th ed.). vol 1. (pp 457-459). Missouri: Saunders Elsevier Co.
- Wilson^a, S, Siedek, E., Thomas, A., King, V., Stirling, C., Plevová, E., Salt, J. & Sture, G. (2014). Influence of maternally-derived antibodies in 6-week old dogs for the efficacy of a new vaccine to protect dogs against virulent challenge with canine distemper virus, adenovirus or parvovirus. *Trials in Vaccinology*, 3(1), 102-106.
- Wilson^b, S., Illambas, J., Siedek, E., Thomas, A., King, V., Stirling, C., Plevová, E., Salt, J. & Sture, G. (2014). The administration of a single dose of a multivalent (DHPPiL4R) vaccine prevents clinical signs and mortality following virulent challenge with canine distemper virus, canine adenovirus or canine parvovirus. *Trials in Vaccinology*, 3(1), 107-113.

IX. ANEXOS

ANEXO I – CALENDÁRIO VACINAL RECOMENDADO PELA WSAVA

Tabela 12 - Calendário vacinal recomendado pela WSAVA (adaptado de Day et al., 2016).

		Tipo	Primovacinação	Vacinação de adultos	Frequência de revacinação	Observações/Recomendações
Vacinas Nucleares	Parvovírus (CPV-2)	VVA/ Morta	Início: > 6-8 semanas Fim: ≥ 16 semanas Reforço vacinal a cada 3-4 semanas	Dose única	Revacinação às 26-52 semanas e depois de 3 em 3 anos ou mais	Só quando não for possível utilizar VVA é que se recorre às vacinas mortas
	Esgana (CDV)	VVA/ rCDV				
	Adenovírus (CAV-2)	VVA				
	Raiva	Morta	Início: ≥ 12 semanas	Dose única	Após um ano e depois de 3 em 3 anos	É uma vacina nuclear de acordo com a legislação de cada país
Vacinas Não-Nucleares	<i>Leptospira interrogans</i>	Morta	Início: ≥ 8 semanas repetir 2-4 semanas depois	Duas doses com 2-4 semanas de intervalo	Anualmente	Zonas geográficas risco de exposição de diferentes serovares
	Parainfluenza (CPIV)	VVA	Início: ≥ 6 semanas repetir 2-4 semanas depois	Duas doses com 2-4 semanas de intervalo (1 dose poderá ser protetora)	Revacinação às 26-52 semanas e depois anualmente	CPIV intranasal induz melhor imunidade local
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (Via intranasal, oral ou parentérica)	VVA (IN / PO)	Dose única às 3 semanas de idade	Dose única	Anualmente ou mais Apenas em animais com risco elevado	Nunca administrar a intranasal por via parentérica Tosse, espirro e corrimento nasal transitórios
		Morta (Parent.)	Início: 6-8 semanas repetir 4 semanas depois	Duas doses com 2-4 semanas de intervalo		Protecção local duvidosa
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Recomb. Morta	Início: ≥ 12 semanas repetir 2-4 semanas depois	Duas doses com 2-4 semanas de intervalo	Anualmente Revacinação sazonal (carraças)	Apenas em zonas de risco elevado A 1ª dose pode ser dada às 9 semanas se risco muito elevado

ANEXO II - BASE DE DADOS

Grupo A	Grupo B	Grupo C
---------	---------	---------

Tabela 13 - Base de dados construída durante o estágio.

	NOME	PROPRIETÁRIO	Nº DA COLHEITA	VACINA UTILIZADA	IDADE
1	Kyara	Miguel Oliveira	1ª	Nobivac DHPPi+L4	16 semanas
2	Nico	Licínia oliveira	1ª	Nobivac DHPPi+L4	8 semanas
3	Isis	Ana Paula Coelho	1ª	-	7 anos
4	Valentino Rossi	Mariana Pinto	1ª	Nobivac DHPPi+L4	11 semanas
5	Fêmea	Carlos Siqueira	1ª	Nobivac Puppy	7 semanas
6	Bock	Carlos Siqueira	1ª	Nobivac Puppy	7 semanas
7	Bulla	Andreia Jacinto	1ª	-	9 anos
8	Kyara	Miguel Oliveira	2ª	Nobivac DHPPi+L4	20 semanas
9	Nico	Licínia oliveira	2ª	Nobivac DHPPi+L4	12 semanas
10	Alpha	Miguel Costa	1ª	Nobivac DHPPi+L4	18 semanas
11	Nina	Gracinda Gomes	1ª	Nobivac DHPPi+L4	13 semanas
12	Olívia	Sofia Cardoso	1ª	Nobivac DHPPi	7 semanas
13	Summer	Joana Lourenço	1ª	Nobivac DHPPi	aprox 12 semanas
14	Cayo	Pedro Matos	1ª	Nobivac DHPPi+L	7 semanas
15	Power of love	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
16	Bolinha	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
17	Jodie	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
18	Branquinha	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
19	Sophie	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
20	Orelha Negra	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
21	Fuji	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
22	Spencer	Isabel Alves	1ª	Nobivac DP	6,5 semanas
23	Açor	José Taboada	1ª	Nobivac DHPPi+L4	16 semanas
24	Caju	Maria Tomás	1ª	Nobivac DHPPi+L4	13 semanas
25	Snoopy	Mª Fernanda Gonçalves	1ª	Nobivac DHPPi+L4	12 semanas
26	Ozzy Cardoso	João Cardoso	1ª	Nobivac DHPPi+L4	10 semanas
27	Nico	Licínia oliveira	3ª	Nobivac DHPPi+L4	16 semanas
28	Camila	Ana Rita Ramos	1ª	Nobivac DHPPi+L4	11 semanas
29	Alpha	Miguel Costa	2ª	Nobivac DHPPi+L4	22 semanas

30	Bali	Artur Alves	1ª	Nobivac DHPPI+L4	8 semanas
31	Nina	Gracinda Gomes	2ª	Nobivac DHPPI+L4	17 semanas
32	Cayo	Pedro Matos	2ª	Nobivac DHPPI+L4	11 semanas
33	Boasson Hagen	Guilherme Barroso	1ª	-	3,5 anos
34	Power of love	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
35	Bolinha	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
36	Jodie	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
37	Branquinha	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
38	Sophie	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
39	Orelha Negra	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
40	Fuji	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
41	Spencer	Isabel Alves	2ª	Nobivac DHPPI	9 semanas
42	Olívia	Sofia Cardoso	2ª	Nobivac DHPPI+L4	16 semanas
43	Caju	Maria Tomás	2ª	Nobivac DHPPI+L4	17 semanas
44	Alpha	Miguel Costa	3ª	Raiva	25 semanas
45	Branquinha	Isabel Alves	3ª	-	10,5 semanas
46	Jodie	Isabel Alves	3ª	-	10,5 semanas
47	Sophie	Isabel Alves	3ª	-	10,5 semanas
48	Bolinha	Isabel Alves	3ª	-	10,5 semanas
49	Power of love	Isabel Alves	3ª	-	10,5 semanas
50	Snoopy	Mª Fernanda Gonçalves	2ª	Nobivac DHPPI+L4	17 semanas
51	Ozzy Cardoso	João Cardoso	2ª	Nobivac DHPPI+L4	17 semanas
52	Maki	Gonçalo dos Santos	1ª	Nobivac DHPPI+L4	aprox 18 semanas
53	Kika	Marina Martins	1ª	-	16 anos
54	Isis	Célia Pereira	1ª	Nobivac DHPPI+L4	12 semanas
55	Jaló	Mª Ivone Figueiredo	1ª	Nobivac DHPPI+L4	6 anos
56	Pupsy	Tânia Sobral	1ª	-	18 anos
57	Puppy	Ana Maria Capucho	1ª	Nobivac DHPPI+L4	14,5 semanas
58	Bali	Artur Alves	2ª	Nobivac DHPPI+L4	13 semanas
59	Skye	Sofia Nolasco	1ª	Nobivac DHPPI+L4	9 semanas
60	Floki	Sofia Nolasco	1ª	Nobivac DHPPI+L4	9 semanas
61	Smash	Sofia Nolasco	1ª	Nobivac DHPPI+L4	9 semanas
62	Atchim	Mª Manuela Silva	1ª	-	Tem 10 meses
63	Olívia	Sofia Cardoso	3ª	Rabisin	19,5 semanas
64	Leo	Sónia Freitas	1ª	-	8 anos
65	Nice	Joel Andrade	1ª	Nobivac DHPPI+L4	11 semanas

66	Pepe	Joel Andrade	1ª	Nobivac DHPPi+L4	11 semanas
67	Izzy	Joana Gonçalves	1ª	Nobivac DHPPi+L4	8,5 semanas
68	Maki	Gonçalo dos Santos	2ª	Nobivac DHPPi+L4	aprox 22 semanas
69	Isis	Célia Pereira	2ª	Nobivac DHPPi+L4	16 semanas
70	Lucas	Rita Costa	1ª	Nobivac DHPPi+L4	9,5 semanas
71	Cacau Vila Nova	Ana Cardão	1ª	Nobivac DHPPi+L4	8 semanas
72	Puppy	Ana Maria Capucho	2ª	Nobivac DHPPi+L4	18,5 semanas
73	Smash	Sofia Nolasco	2ª	Nobivac DHPPi+L4	13 semanas
74	Nice/Night	Joel Andrade	2ª	Nobivac DHPPi+L4	15,4 semanas
75	Pepe	Joel Andrade	2ª	Nobivac DHPPi+L4	15,4 semanas
76	Bali	Artur Alves	3ª	Rabisin	20,7 semanas
77	Cacau Vila Nova	Ana Cardão	2ª	Nobivac DHPPi+L4	12 semanas
78	Lucas	Rita Costa	2ª	Nobivac DHPPi+L4	14 semanas
79	Smash	Sofia Nolasco	3ª	Nobivac DHPPi+L4	16,7 semanas
80	Cacau Vila Nova	Ana Cardão	3ª	Nobivac DHPPi+L4	16 semanas
81	Nice	Joel Andrade	3ª	Rabisin	21 semanas
82	Pepe	Joel Andrade	3ª	Rabisin	21 semanas
83	Izzy	Joana Gonçalves	2ª	Nobivac DHPPi+L4	14 semanas
84	Lucas	Rita Costa	3ª	Rabisin	20 semanas

ANEXO III - RESULTADOS

GRUPO A

Tabela 14 - Identificação dos animais do grupo A.

Animal	1	2	3	4	5
Nome	Power of Love	Bolinha	Jodie	Branquinha	Sophie

Figura 5 - Leitura dos resultados do grupo A.

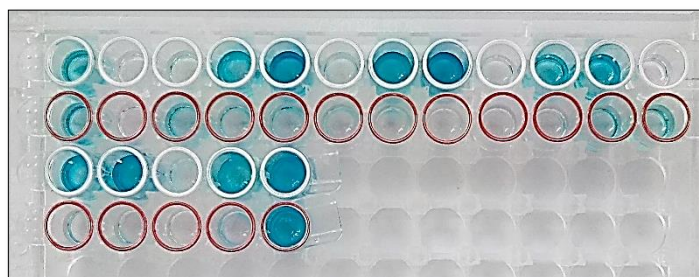


Tabela 15 - Valores de absorvância das amostras do grupo A (D.O. do Controlo Positivo: 1,94).

Animal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	0,953	1,461	2,297	1,397	4,101	1,273
2	0,876	1,252	3,154	1,01	4,325	0,935
3	0,841	1,033	1,916	1,093	2,511	1,688
4	0,629	1,995	3,5	0,999	4,435	1,171
5	0,677	0,748	2,374	1,206	4,653	4,149

Tabela 16 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A.

Animal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-
3	-	-	-	-	+	-
4	-	+	+	-	+	-
5	-	-	+	-	+	+

Tabela 17 - Rácio entre o controlo positivo e as amostras do Grupo A.

Animal	CP : Amostra 1		CP : Amostra 2		CP : Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	0,49	0,75	1,18	0,72	2,11	0,66
2	0,45	0,65	1,63	0,52	2,23	0,48
3	0,43	0,53	0,99	0,56	1,29	0,87
4	0,32	1,03	1,80	0,51	2,29	0,60
5	0,35	0,39	1,22	0,62	2,40	2,14

Tabela 18 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo A tendo em conta o valor do controlo positivo.

Animal	CP : Amostra 1		CP : Amostra 2		CP : Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	+	-	++	-
2	-	-	+	-	++	-
3	-	-	-	-	+	-
4	-	+	+	-	++	-
5	-	-	+	-	++	++

GRUPO B

Tabela 19 - Identificação dos animais do grupo B.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Nome	Nico	Bali	Olívia	Smash	Nice	Pepe	Lucas	Cacau Vila Nova

Figura 6 - Leitura dos resultados do grupo B.



Tabela 20 - Valores de absorvância das amostras do grupo B (D.O. do Controlo Positivo: 1,635).

Animal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	1,042	1,193	3,87	1,384	3,625	3,385
2	2,123	0,938	3,557	3,209	5,384	3,985
3	1,095	0,784	5,69	3,526	4,195	3,013
4	4,799	1,473	4,691	1,307	4,697	4,918
5	0,65	0,985	6,066	0,946	5,029	4,753
6	0,672	1,145	4,872	0,594	3,212	4,829
7	0,629	4,336	4,078	4,31	3,659	4,91
8	0,683	1	6,707	3,77	5,801	4,784

Tabela 21 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B.

Animal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	+	-	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+
6	-	-	+	-	+	+
7	-	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+

Tabela 22 - Rácio entre o controle positivo e as amostras do Grupo B.

Animal	CP : Amostra 1		CP : Amostra 2		CP : Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	0,64	0,73	2,37	0,85	2,22	2,07
2	1,30	0,57	2,18	1,96	3,29	2,44
3	0,67	0,48	3,48	2,16	2,57	1,84
4	2,94	0,90	2,87	0,80	2,87	3,01
5	0,40	0,60	3,71	0,58	3,08	2,91
6	0,41	0,70	2,98	0,36	1,96	2,95
7	0,38	2,65	2,49	2,64	2,24	3,00
8	0,22	0,32	2,12	1,19	1,83	1,51

Tabela 23 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo B tendo em conta o valor do controle positivo.

Animal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CDV	CPV	CDV	CPV	CDV	CPV
1	-	-	++	-	++	++
2	+	-	++	++	+++	++
3	-	-	+++	++	++	++
4	+	-	++	-	++	+++
5	-	-	++	-	+++	+++
6	-	-	+++	-	++	+++
7	-	++	++	++	++	+++
8	-	-	++	+	++	+

GRUPO C

Tabela 24 - Identificação dos animais do grupo C.

Animal	1	2	3	4	5	6	7
Nome	Boasson Hagen	Isis	Jaló	Pupsy	Bulla	Kika	Leo

Figura 7 - Leitura dos resultados do grupo C.

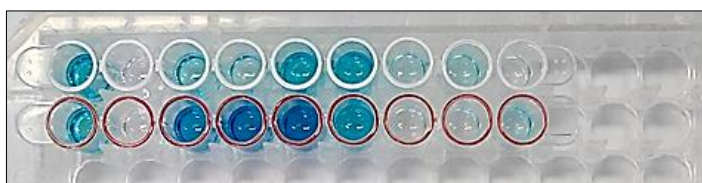


Tabela 25 - Valores de absorvância das amostras do grupo C (D.O. do Controlo Positivo=1,85).

Animal	Amostra 1	
	CDV	CPV
1	1,97	3,715
2	1,318	3,147
3	0,982	0,976
4	0,792	0,632
5	1,073	3,412
6	1,775	2,442
7	0,871	0,815

Tabela 26 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C.

Animal	Amostra 1	
	CDV	CPV
1	+	+
2	-	+
3	-	-
4	-	-
5	-	+
6	-	+
7	-	-

Tabela 27 - Rácio entre o controlo positivo e as amostras do Grupo C.

Animal	CP : Amostra 1	
	CDV	CPV
1	1,06	2,01
2	0,71	1,70
3	0,53	0,53
4	0,43	0,34
5	0,58	1,84
6	0,96	1,32
7	0,47	0,44

Tabela 28 - Resultados qualitativos das amostras do Grupo C tendo em conta o valor do controlo positivo.

Animal	Amostra 1	
	CDV	CPV
1	-	++
2	-	+
3	-	-
4	-	-
5	-	++
6	-	+
7	-	-

ANEXO IV – INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO *KIT* TITERCHEK® CDV/CPV

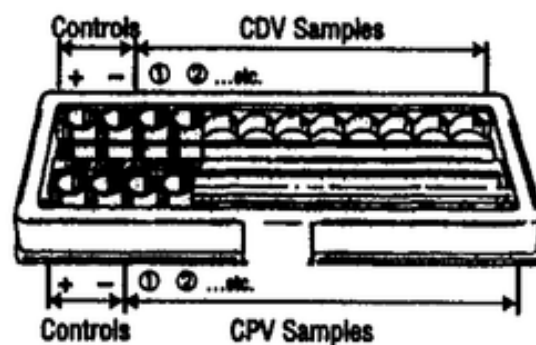
TITERCHEK® CDV/CPV TEST PROCEDURE

For use with Serum or Plasma only. (No Whole Blood.)

NOTE: Prior to use, allow kit components to come to room temperature (21°-25°C)

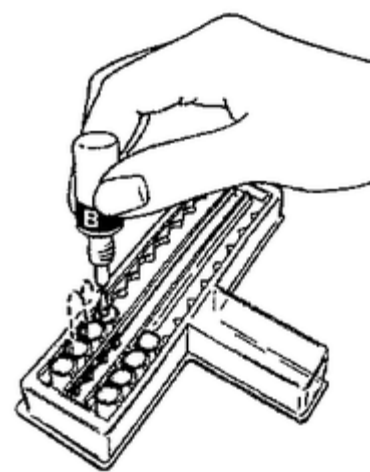
A. SET UP AND SAMPLE INCUBATION

1. Remove and place **CDV wells** (white rim) in top half of holder, one well for Positive Control (**Bottle A - Red Cap**), one well for Negative Control (**Bottle B - Gray Cap**), and one well for each sample to be tested. Place **CPV wells** (red rim) in bottle half of holder; one well for Positive Control, one well for Negative Control and one well for each sample to be tested. Leave the required number of wells attached to each other.



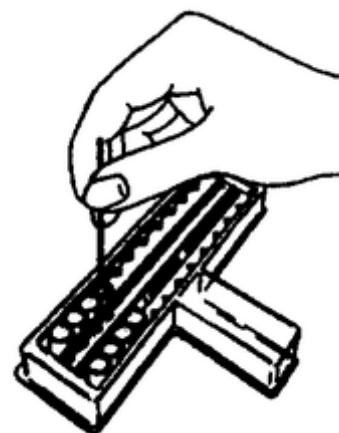
2. Add **1 drop** of Positive Control (**Bottle A - Red Cap**) into the first CDV well and first CPV well.

3. Place **1 drop** of Negative Control/Sample Diluent (**Bottle B - Gray Cap**) into the second CDV well and to each CDV test sample well. Place **1 drop** of Negative Control/Sample Diluent to the second CPV well and to each CPV test sample well.



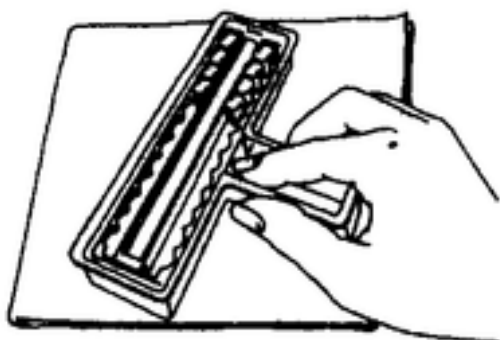
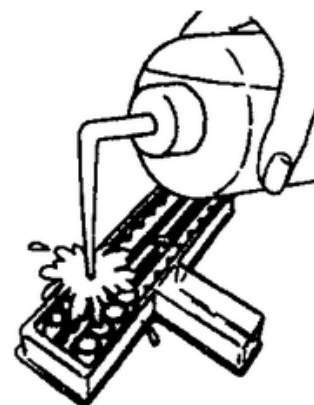
4. Using a separate sample loop for each sample, add 1 loopful (1 μ L) of each sample to each of the CDV and CPV sample wells. Mix sample in diluent thoroughly by twisting the handle of the loop between the thumb and forefinger. Be careful not to splash from well to well. Incubate for 5 minutes at room temperature (21°-25°C; 70°-78°F).

If several samples are run simultaneously, only one set of CDV and CPV controls are needed.



B. BLOT AND WASH

5. Discard the fluid from wells into sink or appropriate container. Wash wells **once by vigorously filling the wells to **overflowing** the **diluted wash solution** (See section IV for preparation).**



Discard excess fluid into sink or appropriate container. Invert holder and blot firmly onto a paper towel to remove final drops.

C. CONJUGATE

6. Add 1 drop of Conjugate (Bottle C - Blue Cap) into each well. Gently tap the holder for 10 - 15 seconds and incubate for 5 minutes at room temperature (21°-25°C; 70°-78°F).

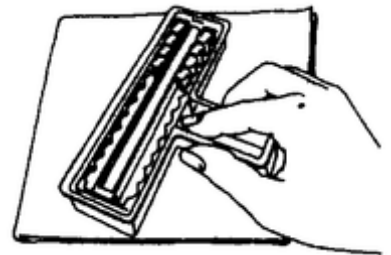


D. BLOT AND WASH



7. Discard the fluid from wells into sink or appropriate container. Wash by vigorously filling the wells to **overflowing** with diluted wash solution. Discard the fluid from the wells and blot after each wash. **Repeat the washing procedure three (3) times.** Wash two more times with **distilled or deionized water** to remove bubbles.

Discard excess fluid into sink or appropriate container. Invert holder and blot firmly onto a paper towel to remove final drops.



E. DEVELOP



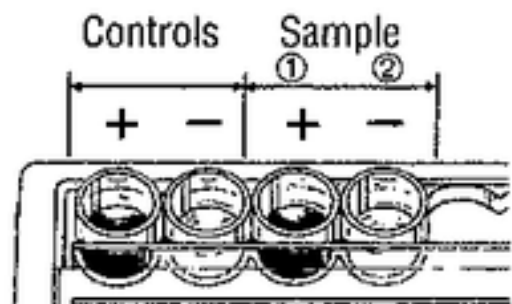
8. Place **2 drops** of Chromogenic Substrate (**Bottle D - Green Cap**) into each well. Mix by gently tapping the holder several times. Incubate 5 minutes.

After incubating, gently tap holder for 5 seconds and **read results immediately.** See Interpretation of Results section.

F. INTERPRETATION OF RESULTS

9. Compare each CDV sample well with the CDV positive and negative control wells.

Compare each CPV sample well with the CPV positive and negative control wells.



Development of a blue color in the sample well that is of equal or greater intensity than the color of the Positive Control well is considered to be positive (CDV SN titer $\geq 1:16$ or CPV HI titer $\geq 1:80$).

No blue color in the sample well or color that is of less intensity than the color of the Positive Control Well is considered to be negative (CDV SN titer $< 1:16$ or CPV HI titer $< 1:80$).

For the test to be valid, the fluid in the positive control well must be distinctly blue, while that in the negative control well must show no color change from initial substrate color.

Results should be interpreted immediately after the 5 minute incubation period in Step 8. Wells can be detached and compared alongside the positive control well using a white background for easier visual inspection.

Good Techniques = Accurate Results

Serum or plasma must be used as a sample.

Hemolyzed and lipemic serum samples may be used however, severely hemolyzed and lipemic samples may produce background color. When in doubt, obtain a better quality sample.

Washing is the most important step. Wells cannot be overwashed. Underwashing will result in color development in the negative control and negative sample wells.

Prolonged incubation for more than 5 minutes in step 8 may result in non-specific color development. If no color is seen after 5 minutes, the sample is negative.

Always compare results to the positive control. The kit negative control is used to verify good washing technique. It should not be used to differentiate positive from negative results.

Do not use the test kit past the expiration date and do not intermix components from different serial numbers.

Store kit at 2°-7°C (36°-45°F). Allow kit to come to room temperature before use.

SYNBIOTICS CORPORATION, 16420 Via Esprillo, San Diego, CA 92127